

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>

Rectora 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.

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

Directora Área Curricular de Farmacia: Maritza Adelina 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 Jouyban, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

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

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

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

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

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

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

Evalúadores:

Cecilia Dobrecky, Ph. D., Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

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

Darío A. Tinjaca, Ph. D. (C), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Eduardo Lagomarsino, Ph. D., Departamento de Farmacia Clínica y Asistencial, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

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

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

Mary Nuñez, Ph. D., Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional del Chaco Austral, Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

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

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

Dos distúrbios psiquiátricos para à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano William Gustavo Lima, Maria Cristina Ramos-Alves, Adriana Cristina Soares	5
Utilização dos métodos automáticos em fluxos com detecção espectrofotométrica na determinação de diclofenaco de sódio em formulações farmacêuticas e fluidos corporais Paulo Roberto Barros Gomes, Victor Elias Mouchrek Filho, Rayone Wesley Santos de Oliveira, Adriana Pereira Everton, Jonas Batista Reis, Hilton Costa Louzeiro, Wellington da Silva Lyra, Maria Alves Fontenele, Danila Teresa Valeriano Alves	29
Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por <i>Escherichia coli</i> Adrian Urbina-Daza, Cira Anaya-Ortega, Maicol Ahumado-Monterrosa, Ricardo Gaitan-Ibarra, Jorge Anaya-Gil	44
Estudio fitoquímico de hojas de <i>Cavendishia compacta</i> (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria Sorantly Paola Vasco Zamudio, William Fernando Castrillón Cardona, Javier Andres Matulevich Pelaez, Laura Ximena Díaz Barrera	61
Essential oils as a source of bioactive molecules Glicerio Leon-Mendez, Nerlis Pajaro-Castro, Enilson Pajaro-Castro, Miladys Torrenegra-Alarcón, Adriana Herrera-Barros	80
Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda César Joe Valenzuela Huamán, Nerio Gongora Amaut, Marley Dueñas Aragón, Lida Velazque Rojas, Alcides Ramos Calcina, Nelly Melinda Valenzuela Huamán	94

Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume contra o caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) Paulo Roberto Barros Gomes, Jonas Batista Reis, Jeremias Caetano da Silva, Rayone Wesley Santos de Oliveira, Maria do Livramento de Paula, Hilton Costa Louzeiro, Victor Elias Moucherek Filho, Maria Alves Fontenele	112
Automedicación en estudiantes de la Sede Neiva de la Universidad Cooperativa de Colombia Claudia Patricia Ortiz, Oscar David Fúnez David, Henry Rubiano Daza, Claudia Lorena García Rojas, Carlos Alberto Calderón Ospina, Daniel Ricardo Delgado	128
CdCl ₂ has zero-order kinetic cellular influx and induces cytotoxicity and genotoxicity at low concentrations in human leukocytes <i>in vitro</i> Vanessa Fontoura dos Santos, Elvio Adílio Serpa, Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, Érico Marlon de Moraes Flores, Michel Mansur Machado, Luís Flávio Souza de Oliveira	145
A descrição matemática do processo da detecção eletroquímica do ácido ascórbico sobre o polímero condutor, dopado pelo íon triiodeto Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvia C. de Oliveira, Zholt O. Kormosh, Olga V. Luganska, Volodymyr V. Parchenko, Yana G. Ivanushko, Petró I. Yagodynets'	159
Análisis teórico de la posibilidad de la detección electroquímica de la sacarina, asistida por oxihidróxido de vanadio Volodymyr Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvia C. de Oliveira, Olga Luganska, Vasyl Lorents, Olga V. Pishak, Roman R. Boychuk, Petro I. Yagodynets'	170
Extracción de glicoalcaloides de papa nativa (<i>Solanum phureja</i>) variedad ratona morada con líquidos presurizados Soany Eraso-Grisales, Diego Mejia-España, Andrés Hurtado-Benavides	181
Abstracts of Iberoamerican Pharmacometrics Network Congress Guadalajara, México. November 7 th -9 th 2018	198

Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano

William Gustavo Lima^{a*}, Maria Cristina Ramos-Alves^b, Adriana Cristina Soares^c

^aLaboratório de Microbiologia Médica. Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ)-Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

*Correio eletrônico: williamgustavofarmacia@hotmail.com

^bFarmacêutica colaboradora. Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)-Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

^cLaboratório de Farmacologia da dor e inflamação. Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ)-Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

Recebido em: 20 de novembro de 2017

Aceito em: 20 de novembro de 2018

RESUMO

O alarmante aumento na taxa de resistência aos antibióticos põe em *check* à eficácia da terapia antibacteriana futura. Em contrapartida, as indústrias farmacêuticas negligenciam os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos em virtude de questões financeiras, legais e farmacológicas. Assim sendo, o reposicionamento de agentes disponíveis clinicamente torna-se uma promissora ferramenta para tentar driblar o desinteresse das indústrias. O fármaco antipsicótico clorpromazina (CPZ) destaca-se por possuir uma ampla faixa de atividade antibacteriana, a qual cobre desde patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, até as micobactérias. A atividade antibacteriana é independente do perfil de susceptibilidade do microrganismo, sendo ela mantida mesmo em cepas altamente resistentes aos antibióticos. Alguns estudos mostram que mesmo nas concentrações clinicamente disponíveis no plasma (entre 0,1-0,5 µg/mL), a CPZ é capaz de matar *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* dentro dos macrófagos. Em adição, estudos clínicos têm revelado os benefícios do uso da CPZ na terapia de suporte para pacientes com infecções em curso. Em conclusão, a CPZ pode eventualmente ser direcionada ao arsenal terapêutico antimicrobiano, especialmente no manejo das infecções causadas por microrganismos intracelulares com fenótipo multirresistente.

Palavras-chave: Reposicionamento de fármacos, fenotiazina, bombas de efluxo, resistência bacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*.

SUMMARY

From psychiatric disorders to antibiotic therapy: repositioning of chlorpromazine as an antibacterial agent

The substantial increase in the antibiotic resistance brings on an alarm to the future of the antibiotic therapy. However, the pharmaceutical industry has been neglecting its investments in new drug research and development, mainly because of the pharmacologic, financial and legal factors. Therefore, the drug repositioning of clinic available agents become a promising tool to bypass the lack of interest of the pharmaceutical industry. A drug used to treat psychoses, the Chlorpromazine (CPZ), stands out as a large spectrum antibiotic, which covers Gram-positive and Gram-negative bacteria, and also mycobacteria. Its antibacterial activity is not related to microorganism susceptibility profile, and it could be maintained even on strains highly resistant to the conventional antibiotics. Studies point out that even on serum concentrations clinically available, the CPZ can eliminate *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* inside of macrophages. In addition, clinical trials have revealed its benefits on support therapy for patients suffering from active infections. As a result, the CPZ could be used as an optional antibiotic therapy, especially in case of infections due to intracellular microorganisms with multidrug resistance phenotype.

Key words: Drug repositioning, phenothiazine, efflux pumps, bacterial resistance, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUÇÃO

O sucesso dos antibióticos em meados do século XX gerou o falso presságio de que as doenças bacterianas tinham sido eficientemente controladas [1]. Entretanto após quase 50 anos percebemos que esta interpretação estava equivocada. Atualmente existe um aumento alarmante na incidência de doenças infecciosas, tornando-as a primeira causa de mortalidade em países subdesenvolvidos e a terceira em países emergentes [2]. A resistência dos microrganismos as terapias convencionais vêm contribuindo para a intensificação e cronificação deste cenário. Anualmente, morrem 700.000 pessoas por infecções causadas por microrganismos resistentes no mundo [3]. Um estudo recente revelou que caso nenhuma medida efetiva seja tomada pelos órgãos de vigilância sanitária dos diferentes países, em 2050 bactérias multirresistentes matarão 1 pessoa a cada 3 segundos no mundo. Isso totalizará 10 milhões de mortes anuais, superando doenças

crônicas como o câncer e o diabetes [4]. No Brasil, o panorama é também preocupante. O Ministério da Saúde estima que das 720.000 infecções hospitalares que ocorrem anualmente no país [5], mais de 70% envolvem bactérias que são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente empregados. O custo hospitalar atribuível à ocorrência dessas infecções é de 651 dólares por dia, passando para 1780 dólares na Unidade de tratamento intensivo (UTI), o que contribui para a elevação expressiva dos custos em saúde pública no país [6].

Na contra mão da reemergência de doenças infecciosas de etiologia bacteriana, observa-se uma negligência de parte das grandes indústrias farmacêuticas nos investimentos voltados a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos [1, 7, 8, 9]. De 1998 a 2002 a agência americana de controle sanitário *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou apenas 7 fármacos voltados ao tratamento de doenças infecciosas, o que equivale a apenas 3% de todos os 225 novos fármacos licenciados neste período. Se comparado ao período de 1983 a 1987, por exemplo, é observada uma redução de 56% no número de antimicrobianos aprovados [1]. O cenário futuro também é pouco promissor. Dos 315 novos fármacos em fase de pesquisa pelas 15 maiores indústrias farmacêuticas do mundo, apenas 5 (menos de 2%) são novos antibacterianos pertencentes a classes já disponíveis no mercado, e somente 3 estão em fase clínica avançada (fase III) [7, 9].

A indústria, no seu modelo de mercado, espera um rápido retorno do capital investido para colocar um novo fármaco na clínica, o qual gira em torno de 400 a 800 milhões de dólares por agente licenciado [10]. Assim sendo, o desinteresse das grandes indústrias do ramo reside no fato de que os exorbitantes custos e a rigorosa legislação aplicada ao desenvolvimento de um novo medicamento não encontram um retorno rápido nos antimicrobianos, devido ao fato de serem utilizados por curtos períodos [11, 12]. Recentemente, porém, o conceito de reposicionamento vem ganhando espaço dentro do mercado farmacêutico ao permitir a redução dos gastos, otimização do tempo de liberação pelas agências de regulação sanitária e redução do preço final de novos fármacos [12]. Nesse modelo de desenvolvimento, compostos que já estão em uso clínico são desviados da sua indicação original e é atribuída uma nova aplicação, passando a serem exigidos apenas testes clínicos que comprovem a eficácia do novo uso [11, 12].

Nesse contexto, a atividade antibiótica de muitos fármacos não-antibacterianos tem sido reconhecida com destaque a clorpromazina (CPZ) [11]. A CPZ, um neuroléptico típico que age inibindo os receptores dopaminérgicos e alguns outros efeitos dependentes de calmodulina, tem apresentado atividade antibacteriana contra várias espécies Gram-negativas e Gram-positivas de interesse médico [13], bem como contra micobactérias [14]. Este composto tem também mostrado a capacidade de reverter à resistência

bacteriana á alguns antibióticos [15, 16], inibir bombas de efluxo [15-18], potencializar o efeito antibacteriano dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, clindamicina, tetraciclina, vancomicina e fluorquinolonas [19, 20], e reduzir a capacidade de formação de biofilmes [21]. O efeito terapêutico da CPZ em humanos com infecções bacterianas em curso tem também sido demonstrado, corroborando assim com os estudos básicos [13]. Nessa revisão, foi resumido o conhecimento atual sobre o efeito antibacteriano da CPZ, focando no espectro de atividade e no mecanismo de ação antibiótico desse composto. Em adição, destaca-se também o efeito da CPZ sobre fatores de virulência e mecanismos de resistências que são associados à patogenicidade bacteriana.

ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DA CLORPROMAZINA

A CPZ é um agente neuroléptico derivado das fenotiazinas que originalmente foi desenvolvido em 1952 como um anti-histamínico para ser usado na potencialização da anestesia geral [22, 23]. Durante os primeiros ensaios clínicos os pacientes passaram a manifestar um estado psicológico caracterizado por indiferença emocional, sem diminuição importante da vigília, que ficou conhecido como síndrome neuroléptica. Esta observação casual estimulou, mais tarde, o uso experimental da droga em pacientes com distúrbios mentais. Os efeitos antipsicóticos da CPZ foram bastante relevantes, e a partir da década de 1960 o seu uso na clínica médica passou a reduzir consideravelmente o número de admissões em hospitais psiquiátricos no mundo todo [23, 24]. Atualmente a Organização Mundial da Saúde lista a CPZ como um dos 5 medicamentos essenciais no manejo terapêutico da esquizofrenia [25].

Quimicamente, a CPZ é caracterizada pela presença de um anel fenotiazídico clássico, i.e., um sistema de 3 anéis do tipo benzeno com o anel central composto de enxofre e nitrogênio [26]. A presença do átomo de cloro em um dos sistemas de anéis garante uma maior biodisponibilidade do fármaco no sistema nervoso central, e o substituinte amina é importante para a interação com os receptores dopaminérgicos (ver a figura 1) [27]. As fenotiazinas podem ser divididas em: fenotiazinas alifáticas (clorpromazina, promazina, trifluorpromazina), fenotiazinas piperidínicas (tioridazina, mepazina, pipotiazina); fenotiazinas piperazínicas (trifluorperazina, tiopropazato, ilufenazina), e aza-fenotiazinas (protipencilil, isotipencilil, oxipencilil) [26].

Como todo antipsicótico típico, a CPZ exerce sua ação farmacológica ao antagonizar os receptores dopaminérgicos do tipo D_2 presentes nos sistemas mesolímbico (efeitos antipsicóticos), mesocortical (efeitos adversos cognitivos e agravamento dos sintomas negativos), nigroestriatal (efeitos extrapiramidais) e túberoinfundibular (efeitos

neuroendócrinos) [28]. Em adição, esse fármaco possui a habilidade de inibir, em menor grau, os receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 e M_2), histamínicos (H_1) e α -adrenérgicos (α_1) [29]. Além dos efeitos neurolépticos induzidos pelo bloqueio dos receptores D_2 , a CPZ também pode ser útil no tratamento da síndrome serotoninérgica por possuir a habilidade de inibir os receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT) [30, 31].

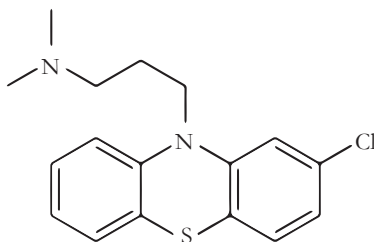


Figura 1. Estrutura química da Clorpromazina. Esse agente neuroléptico é composto por: (i) um anel fenotiazídico, diretamente associado a sua ação farmacológica; (ii) um átomo de cloro, importante na sua biodisponibilidade no sistema nervoso central e (iii) uma amina como substituinte, que está associado a interação com os receptores dopaminérgicos.

A habilidade que a CPZ tem em inibir múltiplos receptores no sistema nervoso central está diretamente relacionada com os vários efeitos adversos associados ao uso desse fármaco. A via dopaminérgica nigroestriatal participa da regulação da atividade motora, assim, por bloquear receptores dopaminérgicos estriatais, a CPZ pode induzir a síndrome de Parkinson, reações distônicas agudas, discinesia tardia, acatisia, acinesia e síndrome neuroléptica maligna [32]. Outros efeitos adversos também de origem central são os que afetam o sistema neuroendócrino associado à inibição dos receptores dopaminérgicos túberoinfundibulares, os quais podem causar ginecomastia, galactorréia e amenorreia [28, 29].

Os neurolépticos atuam também na periferia do organismo, afetando o sistema nervoso autônomo ao inibir respostas colinérgicas dependentes de M_1/M_2 e adrenérgicas dependentes de α_1 , causando sintomas como secura da boca e pele, midríase e dificuldade de acomodação visual, taquicardia, constipação intestinal e retenção urinária [29]. A CPZ pode determinar falso-positivo para gravidez, fenilcetonina e bilirrubina na urina. Aumento nos níveis plasmáticos de colesterol, glicose, prolactina, bilirrubina, iodo, hormônio tireo-estimulante (TSH), cortisol e das enzimas cardíacas e hepáticas têm sido associados ao uso da CPZ nas doses normalmente recomendadas [33]. Em adição, ela costuma deprimir o segmento ST e aumentar os intervalos QT e PR no eletrocardiograma por estar associada a alterações na condução atrioventricular [34].

Somado aos efeitos centrais clássicos produzidos pela inibição de receptores envolvidos na neurotransmissão, a CPZ também modula respostas dependentes de cálcio [35]. Assim como o haloperidol, a CPZ inibe a ligação do cálcio a calmodulina, tendo assim a capacidade de aumentar o tônus imunológico *in vivo* ao estimular a atividade linfocitária [36], além de ser associada a efeitos citotóxicos antineoplásicos [37]. Como a via de sinalização dependente de cálcio-calmodulina é conservada em diferentes organismos, incluindo patógenos, destaca-se para a possibilidade desse agente neuroléptico possuir efeitos antimicrobianos e antiparasitários [38].

De fato, a atividade da CPZ já foi determinada contra *Plasmodium falciparum* [39, 40, 41], *Leishmania* spp. [42,43], *Candida* spp. [44], *Aspergillus* spp. [45], *Scedosporium* spp.[45], Zicomictos [45], *Naegleria fowleri* [46], *Herpes simplex virus* (HSV) [47], Vírus da Encefalite transmitido por carrapatos (TBEV) [48], Vírus da Hepatite B (HBV) [49], *Measles virus* [50], *Sinbdis Virus* [51], *Estomatite virus* [51], *Influenza-virus* [52], *Poliomavirus símio 40* (SV40) [53], *Arenavirus* [54], Vírus da Imunodeficiência humana (HIV) e *John Cunningham virus* (JC vírus) [55]. Em adição, a atividade antibacteriana da CPZ tem sido determinada em vários estudos [15-18, 56, 57]. Assim, destaca-se o potencial de reposicionamento desse agente farmacológico na terapia de diferentes doenças de etiologia infecciosa.

ATIVIDADE DA CPZ CONTRA PATÓGENOS GRAM-POSITIVOS

O *Staphylococcus aureus*, um cocus Gram-positivo, é particularmente sensível aos efeitos antibacterianos da CPZ. O crescimento de linhagens referência e de isolados clínicos de *S. aureus* meticilina-sensível (MSSA) é inibido pela CPZ á concentrações na faixa de 30-64 µg/mL [15, 56, 57, 58]. As linhagens meticilina-resistentes (MRSA) são também susceptíveis a esse fármaco, sendo que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) variam de 40-100 µg/mL contra esses patógenos [15, 16, 18, 58, 59].

O efeito bactericida, por sua vez, começa a ser observado a partir de 60 µg/mL [57], sendo que as linhagens MRSA são menos sensíveis. De fato, a concentração bactericida mínima (CBM) da CPZ varia de 70-80 µg/mL para isolados clínicos de MRSA [15], sendo que um estudo reportou ausência de efeito bactericida contra esse microrganismo (CBM >800µg/mL) [16]. Nehme e colaboradores [58], em um estudo recente, mostraram que a CPZ a 128 µg/mL é hábil para reduzir em 2 log o número de unidades formadores de colônias de *S. aureus* após 3 h de incubação, sendo esse efeito amplificado após 24 h com redução de 4 log. Adicionalmente a atividade antibacteriana direta, a CPZ interage de maneira sinérgica e potencializa a ação de vários antibióticos como a penicilina, clindamicina, ampicilina, ampicacina, gentamicina, tobramicina,

estreptomicina, tetraciclina, oxacilina e vancomicina contra o *S. aureus* [19,20,59]. A interação sinérgica entre CPZ e a Vancomicina foi também relatada contra dois isolados clínicos de *Enterococcus faecium* [60].

O átomo de cloro presente na estrutura da CPZ parece não ser essencial para a atividade antibacteriana, pois a sua remoção promove apenas uma ligeira elevação na CIM contra o MRSA (64-128 µg/mL) *in vitro* [61]. No entanto, vale destacar que a presença do cloro é importante para elevar a biodisponibilidade da CPZ no sistema nervoso central [62]. Assim sendo, a remoção desse átomo estaria associada à preservação da atividade antibacteriana e, em adição, a redução das reações adversas centrais frequentemente associadas a esse fármaco.

Apesar dos testes *in vitro* demonstrarem o efeito anti-estafilocócico da CPZ, as concentrações necessárias para a atividade antibacteriana são quase 60 vezes mais altas que as usualmente mensuradas no plasma de pacientes (entre 0,1-0,5 µg/mL) [29]. Entretanto, nas concentrações clinicamente disponíveis no plasma (0,1 µg/mL) a CPZ consegue matar células de *S. aureus* fagocitadas *in vitro* por macrófagos das linhagens HPBMDM e THP-1 após 6 h de incubação [57]. Isso pode ser justificado pelo fato de o macrófago ser capaz de concentrar a CPZ em até 100-vezes os níveis encontrados no plasma [63]. Em alguns casos as concentrações atingidas no interior dos macrófagos são superiores a necessária para a atividade antimicrobiana [14, 64]. Em adição, na faixa de concentração (0,1-0,01 µg/mL) necessária para matar o *S. aureus* fagocitado, a CPZ não induziu nenhum efeito deletério sobre as células em cultura, como revelado pelas colorações com azul de tripan e naftol azul-negro [57]. Assim sendo, sugere-se que a concentração necessária para induzir o efeito antibacteriano da CPZ contra patógenos intracelulares é associada a uma baixa toxicidade clínica.

Ao contrário da atividade contra *S. aureus*, já bem demonstrada, o efeito da CPZ sobre outros patógenos Gram-positivos ainda não é bem descrito. Nessa direção, a atividade da CPZ contra o *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. têm sido demonstrada [11, 56, 64-67]. Nessa direção, mais estudos devem ser conduzidos para compreendermos melhor o efeito antibacteriano da CPZ contra as demais espécies de bactérias Gram-positivas.

ATIVIDADE DA CPZ CONTRA PATÓGENOS GRAM-NEGATIVOS

Apesar de ainda não estar comprovado o motivo, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes ao efeito antibacteriano da CPZ. Estudos *in vitro* tem revelado que a CPZ é ativa contra as Enterobacteriaceae *Escherichia coli* (CIM 50-64 µg/mL)

[20, 58], *Klebsiella pneumoniae* (CIM 64-128 µg/mL) [58] e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CIM 110-512 µg/mL) [21,63], e contra os bastonetes Gram-negativos não-fermentadores *Acinetobacter antiratus* (CIM 60 µg/mL) [20] e *Acinetobacter baumannii* (CIM 64 µg/mL) [58]. Em adição a atividade bacteriostática contra *A. baumannii*, a CPZ (128 µg/mL) possui a habilidade de reduzir em 3 log a densidade celular desse microrganismo após 3 h de incubação, demonstrando assim o potencial bactericida desse fármaco também contra espécies de Gram-negativas [58]. O efeito antibacteriano também foi mensurado contra *Proteus vulgaris* [20] e *Pseudomonas aeruginosa* [20, 58, 61], mas em ambos os casos a CPZ foi inativa (CIM >500 µg/mL).

Entretanto, sua interação sinérgica com os antibióticos ceftazidima, ceftriaxona, imipeném, estreptomicina, tetraciclina, canamicina, amicacina e tobramacina foi demonstrada contra *E. coli* [20,68-70]. Adicionalmente, a CPZ na concentração de 200 µg/mL potencializa os efeitos antibacterianos do ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacino, cloranfenicol, tetraciclina e brometo de etidium contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [71]. Os resultados indicam que o sinergismo produzido pela combinação da CPZ com os antibióticos disponíveis na clínica se limita as espécies sensíveis a essa fenotiazina isoladamente [20, 71].

Apesar do preciso mecanismo de ação antibacteriano da CPZ ainda não ter sido identificado, alguns trabalhos tem mostrado que essa fenotiazina está relacionada com alterações na parede celular bacteriana (ver figura 2) [56, 72]. Esse fato pode, pelo menos em parte, justificar a atividade mais pronunciada contra as espécies Gram-positivas. Kristiansen em 1979 revelou pela primeira vez que a exposição de *S. aureus* a diferentes concentrações de CPZ (0-200 µg/mL) reduz a liberação de hemolisina no meio de cultura, indicando uma menor permeabilidade celular [56]. Análises posteriores de microscopia eletrônica revelaram que esse efeito é causado pelo aumento na espessura da parede celular induzida pelo composto [72]. Em adição, á altas concentrações (acima de 30 µg/mL) a CPZ é capaz de induzir alterações ultraestruturais na parede de *S. aureus*, produzindo corpos celulares semelhante a mesossomas, além de divisões celulares assimétricas [72]. Recentemente um estudo mostrou que a concentração de 62,5 µg/mL a CPZ foi capaz de romper a membrana plasmática e parede celular de *S. aureus* [59]. As alterações observadas foram semelhantes às induzidas por antibióticos β-lactâmicos, o que sugere um mecanismo de ação similar para CPZ [11].

Além disso, as fenotiazinas são conhecidas por alterar a morfologia das bactérias Gram-negativas em concentrações subinibitórias [13]. As alterações estão especificamente relacionadas com a espécie, de tal forma que a CPZ causa a filamentação de *E. coli* [73] e modificações ribossomais e proteicas em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [63]. A CPZ (60-40 µg/mL) induz a filamentação de *E. coli* após 5 h de incubação,

entretanto a partir de 8 h a forma bastonete começa a prevalecer novamente, até total reversão para a morfologia normal após 24 h. A determinação das proteínas que formam o envelope celular de *E. coli* revelou que durante a filamentação existe uma alteração no padrão de expressão. Nesse caso, certas proteínas da parede celular são reguladas positivamente, as quais reduzem a permeabilidade de CPZ e assim, permite a reversão para a morfologia normal [73]. Interessantemente, de maneira semelhante à CPZ, os β -lactâmicos também estimulam a filamentação de *E. coli*, o que reforça um mecanismo de ação similar entre essas duas substâncias [74].

Alterações morfológicas em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium são também observadas. A CPZ a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$ induz uma distribuição citosólica anormal dos ribossomos, além de aumentar a formação de estruturas semelhantes a mesossomas. Na parede celular de *S. enterica*, a CPZ produz espaços terminais e reduz as granulações. A análise eletroforética dessa estrutura revela que a CPZ promove a completa perda de proteínas com 55 kDa. Em adição, após a exposição para CPZ, a aglutinação de *S. enterica* pela adição de anticorpos dirigidos ao antígeno O é completamente perdida. Esses resultados confirmam a parede celular como alvo primário da ação antibacteriana desse agente neuroléptico [63]. Entretanto, diferente das espécies Gram-positivas, para acessar os componentes da parede celular de Gram-negativas, a CPZ precisa primeiramente atravessar a membrana externa. As espécies Gram-negativas são particularmente resistentes a uma série de fármacos, pois muitos dos agentes antibacterianos não conseguem vencer essa barreira [75]. Entretanto, o papel da membrana externa na resistência intrínseca das espécies Gram-negativas aos efeitos antibacterianos da CPZ ainda precisa ser determinado.

Em adição aos efeitos da CPZ na estrutura da parede celular bacteriana, um estudo recente tem mostrado que esse fármaco pode também agir em alvos intracelulares. A ribonuclease P (RNase P), uma ribozima essencial para a replicação do material genético de eubactérias, responsável pela 5'-maturação dos precursores de tRNA, é particularmente sensível aos efeitos inibitórios da CPZ (figura 2) [76,77]. A atividade enzimática da RNase P de *M. tuberculosis* (K_i 161 $\pm$ 16 μM), *Mycoplasma hyopneumoniae* (K_i 170 $\pm$ 9,2 μM) e *E. coli* (K_i 437 $\pm$ 33 μM), medida pela capacidade de clivagem do tRNA, foi eficientemente inibida pela CPZ [77]. Esse fato reflete que a CPZ apresenta mecanismos de ação independente da parede celular bacteriana, a qual inclui alvos conservados entre várias espécies de bactérias, como o caso das ribonucleases. Esse fato justifica o espectro antibacteriano estendido desse composto.

ATIVIDADE CONTRA MICOBACTÉRIAS

Vários estudos demonstram que a CPZ possui atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* em concentrações a partir de 1 µg/mL, a qual é 10 vezes superior a comumente encontrada no plasma após uma dose usual desse fármaco [78-85]. Entretanto, o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular com tropismo por macrófagos humanos [86]. Assim sendo, a capacidade que essas células têm de concentrar a CPZ pode favorecer a sua atividade antimicobacteriana.

De fato, vários estudos têm demonstrado que a morte de *M. tuberculosis* fagocitados por macrófagos é reforçada por concentrações de CPZ a partir de 0,1 µg/mL [14, 79, 87, 88]. É importante notar que enquanto muitos compostos têm demonstrado ter atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis*, poucos destes penetram no macrófago e retêm a atividade contra as micobactérias intracelulares. Corroborando com esses dados de que as fenotiazinas promovem a morte de micobactérias intracelulares, camundongos infectados com *M. tuberculosis* foram curados desta infecção quando tratados com análogos estruturais da CPZ [89].

Em adição, estudos têm mostrado que, mesmo em linhagens altamente resistentes a isoniazida e rifamicina, o efeito da CPZ é mantido ao mesmo nível de controles sensíveis as terapias convencionais [78]. Assim sendo, essas evidências apontam que a CPZ deve ser seriamente considerada para a terapêutica da tuberculose, principalmente quando causada por cepas multirresistentes [90-92].

EFEITO DA CPZ SOBRE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

As fenotiazinas inibem o transporte de cálcio (Ca^{2+}), impedindo a sua ligação às proteínas de ligação ao Ca^{2+} , como a calmodulina [35]. Isto significa que os sistemas enzimáticos que são dependentes de Ca^{2+} , tais como os envolvidos na geração de energia celular a partir da hidrólise de ATP, são inibidos [93]. Esses sistemas podem ser muitas vezes associados ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos em diferentes espécies de bactérias [38]. Entre os quatro mecanismos gerais de resistência (*i.e.*, inativação do fármaco, alteração do alvo, efluxo do antibiótico e impermeabilização da membrana) a extrusão dos compostos antibacterianos por bombas de efluxo é com certeza um dos mais importantes fatores de resistência para múltiplos antibióticos (MDR). Isso ocorre, pois diferente dos outros mecanismos, as bombas de efluxo apresentam alta eficiência de extrusão dos fármacos e uma ampla especificidade de substratos, podendo assim, conferir resistência a múltiplos agentes [94].

De acordo com a sua composição, número de alças transmembrânicas e fontes de energia e substrato, as bombas de efluxo podem ser classificadas em 5 famílias: família de resistência divisão-nodulação (RND, do inglês *resistance-nodulation-division*) [95], superfamília facilitadora principal (MFS, do inglês *major facilitator superfamily*) [96], cassete de ligação ao ATP (ABC, do inglês *ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette*) [97], pequenos efluxos relacionados a multirresistência (SMR, do inglês *small multidrug resistance family*) [98] e família de extrusão de compostos tóxicos e múltiplas drogas (MATE, do inglês *multidrug and toxic compound extrusion family*) [99]. A família ABC possui como fonte de energia o ATP, assim sendo, é possível que a CPZ, ao bloquear os sistemas enzimáticos dependentes de Ca^{2+} que hidrolisam o ATP, possa estar associada à inibição dessas bombas de efluxo [97]. Nessa direção, diversos estudos têm demonstrado que CPZ reverte o fenótipo MDR de bactérias por inibir sistemas de efluxo [15-18].

A CPZ em concentrações não antibacterianas (referente a 50% da CIM) é capaz de inibir as bombas de efluxo sensíveis a reserpina em MRSA [15,16]. A utilização dessa fenotizina reduziu a CIM da oxacilina de $>800 \mu\text{g/mL}$ para $100 \mu\text{g/mL}$. Em um isolado de MRSA, a CIM da oxacilina reduziu em mais de 40 vezes, e esse β -lactâmico foi efetivo a concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ quando combinada com a CPZ [16]. Adicionalmente, CPZ inibe o transportador NorA em *S. aureus*.

A exposição de *S. aureus* que superexpressam NorA, a concentrações subinibitórias (25% da CIM) da CPZ eleva consideravelmente a sensibilidade ao norfloxacino (aumento de 4 vezes) e aos cátions inorgânicos brometo de etídio (EtBr) (aumento de 5 vezes) e brometo de tetrafenilfosfônio (TPP) (aumento de 8 vezes) [18]. NorA é uma proteína com 388 aminoácidos e de 12 alças transmembrânicas pertencentes a família MFS que pode extrair uma variedade de compostos antibacterianos como fluorquinolonas hidrofílicas (norfloxacino e ciprofloxacino), corantes (como o brometo de etídio) e quartenários de amônio biocidas [17,18]. Semelhante a outros membros da família MFS, a NorA emprega como fonte de energia a força próton-motriz dependente de H^+ . Em adição ao conhecido efeito sobre os íons Ca^{2+} , outros estudos mostram que CPZ inibe também o transporte do íon H^+ em células intestinais de coelhos [100] e em leveduras [101]. Em células de *S. aureus*, a inibição dos transportadores dependentes de H^+ promove uma redução na variação do potencial elétrico transmembrana (Ψ), a qual culmina na queda da força motriz do sistema para 23% do seu total [18]. Assim sendo, tem sido mostrado que a CPZ inibe a NorA por induzir um colapso na fonte energética dessa bomba de efluxo (ver figura 2).

Em adição a NorA, a bomba de efluxo para tetraciclina TetK também é inibida pela CPZ em *S. aureus*. A exposição de $25 \mu\text{g/mL}$ por 24 h reduz a CIM da tetraciclina de

6,25 µg/mL para 0,78 µg/mL (redução de 8 vezes) em linhagens de *S. aureus* TetK-positivas [18]. A inibição de TetK, provavelmente é também devido a inibição da força próton motriz, uma vez que assim como a NorA, esse sistema de efluxo é pertencente a família MFS. No entanto, além dos efeitos sobre a força motriz, parece que os elétrons π do sistema de anéis nas fenotiazinas contribuem para uma inibição direta sobre as bombas de efluxo. Essa região possibilita uma ligação eletrofílica com resíduos importantes para a atividade coordenada dessas proteínas, o que pode comprometer a ligação com o substrato e assim reduzir a sua capacidade de extrusão (ver figura 2) [17].

A CPZ também inibe bombas de efluxo presentes em bactérias Gram-negativas. Nas concentrações a partir de 2 µg/mL essa fenotiazina bloqueia os sistemas de efluxo em *S. enterica* sorovar Typhimurium. Esse efeito foi similar ao observado pelo tratamento com o Fenil-arginina- β -naftilamina (PA β N) e o Carbonil Cianido m-clorofenilhidrazona (CCCP) inibidores competitivos das bombas de efluxo pertencentes à família RND e da força próton-motriz, respectivamente [21]. A CPZ (200 µg/mL) eleva a concentração intracelular do brometo de etidium em *S. enterica* sorovar Typhimurium em quase 4-vezes por inibir o sistema de efluxo tripartite AcrAB-TolC, o qual é conhecido pela extrusão desse corante antibacteriano. A inibição desse sistema de efluxo pela CPZ é tão eficiente que em linhagens de *S. enterica* sorovar Typhimurium com deleção dos genes *tolC* ou *acrB*, o acúmulo do brometo de etidium ocorreu em um nível inferior ao induzido pelo uso do agente neuroléptico [71].

As fenotiazinas também afetam a expressão de genes que codificam determinantes de resistência. Um estudo tem revelado, por exemplo, que a prometazina é capaz de eliminar plasmídeos que carregam genes codificadores de bombas de efluxo em *E. coli*, reduzindo a CIM para tetraciclinas [17]. A CPZ reduz também a expressão dos genes *mecA* e *blaZ* induzidos pela oxacilina em *S. aureus*, os quais são envolvidos na codificação da proteína de ligação a penicilina do tipo 2a (PBP2a) e β -lactamases, respectivamente [59]. Na *S. enterica* sorovar Typhimurium a CPZ reduz a expressão do gene *acrB* o qual codifica uma bomba de efluxo envolvida na extrusão do cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, triclosano e solventes orgânicos [71].

Outros mecanismos de resistência, como as enzimas aminoglicosídeo fosforilases [102], são também dependentes de ATP. Além disso, diversas outras bombas de efluxo são dependentes da força próton-motriz [96, 98, 99]. Entretanto, até a presente revisão, não existem evidências sobre o papel da CPZ nesses sistemas relacionados à resistência aos antibióticos. Assim sendo, mais estudos devem ser conduzidos nesse sentido, objetivando alcançar uma compreensão mais ampla sobre o papel da CPZ nesses diferentes determinantes de resistência.

Um estudo tem demonstrado que a CPZ inibe a formação de biofilme por *S. enterica* sorovar Typhimurium [21]. A revelação do biofilme pelo ensaio do cristal violeta mostrou que o uso de concentrações subinibitórias da CPZ (a partir de 2 µg/mL) foi capaz de reduzir a formação do biofilme de maneira dose-dependente. O efeito parece ser associado à capacidade que a CPZ tem de inibir os sistemas de efluxo. A inibição da formação de biofilme pelo composto foi similar ao induzido pela remoção experimental dos genes *tolC* e *acrB*, os quais codificam para proteínas de efluxo homólogas pertencentes a família RND [21].

Além da formação de biofilmes, existe uma série de outros fatores relacionados à patogenicidade de bactérias [103, 104]. Esses incluem a produção de toxinas, invasinas (proteases, lipases e sacaridasas), enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase), adesinas e cápsulas. Tem sido demonstrado que a fenotiazina prometazina reduz a adesão de *E. coli* nas células epiteliais HEP-2 em cultura, sugerindo uma inibição na produção de adesinas [58, 105]. Entretanto, apesar da evidência que as fenotiazinas inibem a produção de certos fatores de virulência, nenhum estudo tem descrito o efeito da CPZ além do biofilme.

CONCLUSÃO

Em resumo, a CPZ apresenta uma potente atividade antibacteriana contra micobactérias e patógenos Gram-positivos intracelulares. A capacidade que as células monofagocitárias têm de concentrar esse agente neuroléptico está relacionado a uma importante vantagem farmacocinética, uma vez que *M. tuberculosis* e *S. aureus* apresentam forte tropismo para monócitos e macrófagos. Em adição, a CPZ é capaz de inibir bombas de efluxo e promover a reversão fenotípica de bactérias resistentes, tornando-as altamente susceptíveis para as terapias convencionais. Assim sendo, conclui-se com essa revisão que a CPZ pode eventualmente ser direcionada para o arsenal terapêutico antimicrobiano contra patógenos intracelulares, especialmente no que se refere ao manejo das infecções causadas por cepas resistentes as terapias convencionais.

Entretanto, embora existam fortes evidências sobre o potencial terapêutico da CPZ em infecções bacterianas o seu uso não é recomendado nesse momento, a menos que exista a necessidade da terapia passiva, ou seja, caso tenha exaurido todas as medidas terapêuticas tradicionais disponíveis. Para introduzir a CPZ, como monoterapia ou terapia combinada, no entanto, são necessários estudos *in vivo* que busquem descrever o perfil de eficácia e segurança desse composto em um contexto de infecções sistêmicas. Além disso, mais estudos clínicos controlados devem ser conduzidos para avaliar o risco-benefício associado à inclusão da CPZ no protocolo terapêutico das doenças infecciosas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UFSJ pelo apoio instrumental na busca dos estudos empregados nessa revisão. W.G.L. agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse com indústrias, empresas ou órgãos de fomentos.

REFERÊNCIAS

1. B. Spellberg, J.H. Powers, E.P. Brass, L.G. Miller, J.E. Edwards, Trends in Anti-microbial Drug Development: Implications for the Future, *Clin. Infect. Dis.*, **38**, 1279 (2004).
2. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death: The 10 leading causes of death by country income group. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>, consultado em maio de 2016.
3. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. URL: http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf?ua=1, acessado em maio de 2016.
4. J. O'Neill, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, *Review on Antimicrobial Resistance* (2016).
5. L.M. Barros, J.N.B. Castro, J.A. Caetano, R.A.N. Moreira, F.G.F. Pereira, N.M. Frota, *et al.*, Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **33**, 429 (2012).
6. L.D. Sanchez-Velazquez, S.P.L. Rosales, M.S.R. Fausto, The burden of nosocomial infection in the intensive care unit: effects on organ failure, mortality and costs. A Nested case-control study, *Arch. Med. Res.*, **37**, 370 (2006).
7. G.H. Talbott, J. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, J.G. Bartlett, Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.*, **42**, 657 (2006).

8. H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert D, L.B. Rice, *et al.*, Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.*, **48**, 1 (2009).
9. U. Theuretzbacher, Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn?, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 15 (2009).
10. J.A. Dimasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski, The price of innovation: new estimates of drug development costs, *J. Health. Econ.*, **22**, 151 (2003).
11. J.E. Kristiansen, L. Amaral, The potential management of resistant infections with non-antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 319 (1997).
12. K. Ahmed, H.V. Shaw, A. Koval, V.L. Katanaev, A second WNT for old drugs: drug repositioning against WNT-dependent cancers, *Cancers (Basel)*, **8**, E66 (2016).
13. L. Amaral, M. Viveiros, J. Molnar, Antimicrobial activity of phenothiazines, *In Vivo*, **18**, 725 (2004).
14. J.A. Crowle, G.S. Douvas, M.H. May, Chlorpromazine: a drug potentially useful for treating mycobacterial infections, *Chemotherapy*, **38**, 410 (1992).
15. M.M. Kristiansen, C. Leandro, D. Ordway, M. Martins, M. Viveiros, T. Pacheco, *et al.*, Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) to oxacillin in vitro, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22**, 250 (2003).
16. M.M. Kristiansen, C. Leandro, D. Ordway, M. Martins, M. Viveiros, T. Pacheco, *et al.*, Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump, *In Vivo*, **20**, 361 (2006).
17. J. Molnár, A. Hevér, I. Fakla, J. Fischer, I. Ocsovski, A. Aszalós, Inhibition of the transport function of membrane proteins by some substituted phenothiazines in *E. coli* and multidrug resistant tumor cells, *Anticancer Res.*, **17**, 481 (1997).
18. G.W. Kaatz, V.V. Moudgal, S.M. Seo, J.E. Kristiansen, Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 719 (2003).
19. J.E. Kristiansen, The antimicrobial activity of psychotherapeutic drugs and stereo-isomeric analogues, *Dan. Med. Bull.*, **37**, 165 (1990).

20. L. Amaral, J. Kristiansen, V. Lorian, Synergic effect of chlorpromazine on the activity of some antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **30**, 556 (1992).
21. S. Baugh, A.S. Ekanayaka, L.J. Piddock, M.A. Webber, Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in impaired ability to form a biofilm, *J. Antimicrob. Chemother.*, **67**, 2409 (2012).
22. P. Charpentier, P. Gailliot, R. Jacob, J. Gaudechon, P. Buisson, Recherches sur les diméthylaminopropyl-N phénothiazines substituées, *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, **235**, 59 (1952).
23. W.W. Shen, A history of antipsychotic drug development, *Compr. Psychiatry*, **40**, 407 (1999).
24. M.E. Lickey, B. Gordon, Medicamentos para las enfermedades mentales, *Labor: Barcelona*, **78** (1986).
25. World Health Organization (WHO). WHO model list of essential medicines. URL: apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1. 18th, consultado em abril de 2013.
26. B.G. Katzung, "Farmacologia: básica e clínica", Guanabara Koogan Eds., Rio de Janeiro, 2005, vol. 9, p. 1216.
27. F.G. Graeff, Antipsicóticos. em: "Drogas psicotrópicas e seu modo de ação", E.P.U. Eds., São Paulo, 1989, vol. 1, p. 110.
28. F.G. Graeff, F.S. Guimarães, "Fundamentos de psicofarmacologia", Atheneu Eds., São Paulo, 1999, vol. 2, p. 288.
29. R.C.B. Silva, Esquizofrenia: uma revisão, *Psicologia USP*, **17**, 263 (2006).
30. P.K. Gillman, Serotonin syndrome: history and risk, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **12**, 482 (1998).
31. P.K. Gillman, The serotonin syndrome and its treatment, *J. Psychopharmacol.*, **13**, 100 (1999).
32. J.D. Wildin, B.J. Pleuvry, G.E. Mawer, Impairment of psychomotor function at modest plasmaconcentrations of carbamazepine after administration of liquid suspension to naive subjects, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **35**, 14 (1993).

33. G. Wik, Effects of neuroleptic treatment on cortisol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyl glycol levels in blood, *J. Endocrinol.*, **144**, 425 (1995).
34. L.J. Lipka, C.M. Lathers, J. Roberts, Does chlorpromazine produce cardiac arrhythmia via the central nervous system?, *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 968 (1988).
35. S.Y. Choi, Y.H. Kim, Y.K. Lee, K.T. Kim, Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells, *Br. J. Pharmacol.* **132**, 411 (2001).
36. N. Ghosh, U. Chattopadhyay, Enhancement of immune response by phenothiazine administration, *In Vivo, In Vivo*, **7**, 435 (1993).
37. T. Lialiaris, A. Pantazaki, E. Sivridis, D. Mourelatos, Chlorpromazine-induced damage on nucleic acids: a combined cytogenetic and biochemical study, *Mutat. Res.*, **265**, 155 (1992).
38. A. Martins, L. Machado, S. Costa, P. Cerca, G. Spengler, M. Viveiros, *et al.*, Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **37**, 410 (2011).
39. C.M. Menezes, K. Kirchgatter, S.M. Di Santi, C. Savalli, F.G. Monteiro, G.A.Paula, *et al.*, In vitro chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian *Plasmodium falciparum*: intrinsic antimalarial activity of phenothiazine drugs, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**, 1033 (2002).
40. J. Guan, D.E. Kyle, L. Gerena, Q. Zhang, W.K. Milhous, A.J. Lin, Design, synthesis and evaluation of new chemosensitizers in multi-drug-resistant *Plasmodium falciparum*, *J. Med. Chem.*, **45**, 2741 (2002).
41. M. Kalkanidis, N. Klonis, L. Tilley, L.W. Deady, Novel phenothiazine antimalarials: synthesis, antimalarial activity, and inhibition of the formation of beta-haematin, *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 833 (2002).
42. R.D. Pearson, A.A. Manian, D. Hall, J.L. Marcus, E.L. Hewlett, Antileishmanial activity of chlorpromazine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**, 571 (1984).
43. J.D. Berman, L.S. Lee, Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages *in vitro*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**, 947 (1983).
44. L. Galgóczy, A. Bácsi, M. Homa, M. Virágh, T. Papp, C. Vágvölgyi, *In vitro* antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species, *Mycoses*, **54**, 737 (2011).

45. R.G. Vitale, J. Afeltra, J.F. Meis, P.E. Verweij, Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and *zygomycetes*, *Mycoses*, **50**, 270 (2007).
46. J.H. Kim, S.Y. Jung, Y.J. Lee, K.J. Song, D. Kwon, K. Kim, *et al.*, Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 4010 (2008).
47. Y. Shimizu, Modification of host cell membrane after herpes simplex virus infection, *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, **33**, 338 (1971).
48. H. Libikowa, D. Stancek, V. Wiedermann, J. Hasto, S. Breier, Psychopharmacy and electroconvulsive therapy in relation to viral antibodies and interferon. Experimental and clinical study, *Arch. Immunol. Ther. Exp. Warsz.*, **25**, 641 (1977).
49. S.Z. Hirschman, E. Garfinkel, Inhibition of hepatitis B DNA polymerase by intercalating agents, *Nature*, **271**, 681 (1978).
50. W. Bohn, G. Rutter, H. Hohenberg, K. Mannweiler, Inhibition of measles virus budding by phenothiazines, *Virology*, **15**, 44 (1983).
51. M.J. Schlesinge, D. Cahill, Verapamil and chlorpromazine inhibit the budding of Sindbis and vesicular stomatitis viruses from infected chicken embryo fibroblasts, *Virology*, **168**, 187 (1989).
52. K.M. Nugent, J.D. Shanley, Verapamil inhibits influenza A virus replication, *Arch. Virol.*, **81**, 163 (1984).
53. H. Hirai, S. Takeda, S. Natori, K. Sekimizu, Inhibition of SV40 DNA replication in vitro by chlorpromazine, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 565 (1993).
54. N.A. Candurra, L. Maskin, E.B. Damonte, Inhibition of arenavirus multiplication in vitro by phenothiazines, *Antiviral Res.*, **31**, 149 (1996).
55. W.J. Atwood, A combination of low-dose chlorpromazine and neutralizing antibodies inhibits the spread of JC virus (JCV) in a tissue culture model: implications for prophylactic and therapeutic treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy, *J. Neurovirol.*, **7**, 307 (2001).
56. J.E. Kristiansen, Experiments to illustrate the effect of chlorpromazine on the permeability of the bacterial cell wall, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.*, **87**, 317 (1979).

57. D. Ordway, M. Viveiros, C. Leandro, M. Jorge Arroz, J. Molnar, J.E. Kristiansen, *et al.*, Chlorpromazine has intracellular killing activity against phagocytosed *Staphylococcus aureus* at clinical concentrations, *J. Infect. Chemother.*, **8**, 227 (2002).
58. H. Nehme, P. Saulnier, A. A. Ramadan, V. Cassisa, C. Guillet, M. Eveillard, A. Umerska, Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity, *PLoS One*, **13**, e0189950 (2018).
59. R. Kong, O.H. Kang, Y.S. Seo, S.H. Mun, T. Zhou, D.W. Shin, *et al.*, The inhibition effect of Chlorpromazine against the b-lactam resistance of MRSA, *Asian Pacific J. Trop. Med.*, **9**, 542 (2016).
60. M. Rahbar, H. Mehrgan, S. Hadji-Nejad, Enhancement of vancomycin activity by phenothiazines against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *in vitro*, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **107**, 676 (2010).
61. O. Hendricks, T.S. Butterworth, J.E. Kristiansen, The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **22**, 262 (2003).
62. K. Dudley, X. Liu, S. De Haan. Chlorpromazine dose for people with schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **13**, 4 (2017).
63. L. Amaral, J.E. Kristiansen, M. Viveiros, J. Atouguia, Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy, *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**, 505 (2000).
64. L. Amaral, J.E. Kristiansen, Phenothiazines: potential management of Creutzfeldt-Jakob disease and its variants, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18**, 411 (2001).
65. J. Molnár, Y. Mándi, J. Király, Antibacterial effect of some phenothiazine compounds and R-factor elimination by chlorpromazine, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **23**, 45 (1976).
66. J.E Kristiansen, I. Mortensen, Antibacterial effect of four phenothiazines, *Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 100 (1987).
67. L. Amaral, J. Kristiansen, V. Lorian, Synergic effect of chlorpromazine on the activity of some antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **30**, 556 (1992).

68. H.D. Coutinho, J.G. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine, *Chemotherapy*, **54**, 328 (2008).
69. H.D. Coutinho, J.G. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*, *Indian. J. Med. Res.*, **129**, 566 (2009).
70. H.D. Coutinho, J.G. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, Increasing of the aminoglycoside antibiotic activity against a multidrug-resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and chlorpromazine, *Biol. Res. Nurs.*, **11**, 332 (2010).
71. A.M. Bailey, I.T. Paulsen, L.J. Piddock, RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3604 (2008).
72. J.E. Kristiansen, J. Blom, Effect of chlorpromazine on the ultrastructure of *Staphylococcus aureus*, *Acta Pathol. Microbiol. Scand B.*, **89**, 399 (1981).
73. L. Amaral, V. Lorian, Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1923 (1991).
74. B.G. Spratt, A.B. Pardee, Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*, *Nature*, **254**, 516 (1975).
75. A.H. Delcour, Outer membrane permeability and antibiotic resistance, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1794, 808 (2009).
76. J.W. Brown, The Ribonuclease P Database, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 314 (1999).
77. W.U. Shiyong, M. Guanzhong, A.L. Kirsebom, Inhibition of Bacterial RNaseP RNA by Phenothiazine Derivatives, *Biomolecules*, **6**, 38 (2016).
78. L. Amaral, J.E. Kristiansen, L.S. Abebe, W. Millett, Inhibition of the respiration of multi-drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by thioridazine: potential use for initial therapy of freshly diagnosed tuberculosis, *J. Antimicrob. Chemother.*, **38**, 1049 (1996).
79. M.V. Reddy, G. Nadadhur, P.R. Gangadharam, In-vitro intracellular antimycobacterial activity of trifluoperazine, *J. Antimicrob. Chemother.*, **37**, 196 (1996).
80. D.V. Gadre, V. Talwar, *In vitro* susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains to trifluoperazine, *J. Chemother.*, **11**, 203 (1999).

81. P. Ratnakar, S.P. Rao, P. Sriramara, P.S. Murthy, Structure–antitubercular activity relationship of phenothiazine-type calmodulin antagonists, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, **10**, 39 (1995).
82. A.B. Bate, J.H. Kalin, E.M. Fooksman, E.L. Amorose, C.M. Price, H.M. Williams, *et al.*, Synthesis and antitubercular activity of quaternized promazine and promethazine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1346 (2007).
83. M.V. Bettencourt, S. Bosne-David, L. Amaral, Comparative in vitro activity of phenothiazines against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16**, 69 (2000).
84. D.V. Gadre, V. Talwar, H.C. Gupta, P.S. Murthy, Effect of trifluoperazine, a potential drug for tuberculosis with psychotic disorders, on the growth of clinical isolates of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, **13**, 129 (1998).
85. T. Yano, L.S. Li, E. Weinstein, J.S. Teh, H. Rubin, Steady-state kinetics and inhibitory action of antitubercular phenothiazines on *Mycobacterium tuberculosis* type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2), *J. Biol. Chem.*, **281**, 11456 (2006).
86. B.M. Saunders, W.J. Britton, Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis, *Immunol. Cell Biol.*, **85**, 103 (2007).
87. M. Martins, Z. Schelz, A. Martins, J. Molnar, G. Hajos, Z. Riedl, *et al.*, In vitro and ex vivo activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **29**, 338 (2007).
88. D. Ordway, M. Viveiros, C. Leandro, R. Bettencourt, J. Almeida, M. Martins *et al.*, Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 917 (2003).
89. E.A. Weinstein, T. Yano, L.S. Li, D. Avarbock, A. Avarbock, D. Helm, *et al.*, Inhibitors of type II NADH: menaquinone oxidoreductase represents a class of antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4548 (2005).
90. L. Amaral, M. Viveiros, J.E. Kristiansen, ‘Non-antibiotics’: alternative therapy for the management of MDRTB and MRSA in economically disadvantaged countries, *Curr. Drug Targets*, **7**, 887 (2006).

91. L. Amaral, M. Martins, M. Viveiros, Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps, *J. Antimicrob. Chemother.*, **59**, 1237 (2007).
92. L. Amaral, J.E. Kristiansen, Phenothiazines: an alternative to conventional therapy for the initial management of suspect multidrug resistance tuberculosis. A call for studies, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **14**, 173 (2000).
93. P.R. Kodavanti, W.R. Mundy, H.A. Tilson, G.J. Harry, Effects of selected neuro-active chemicals on calcium transporting systems in rat cerebellum and on survival of cerebellar granule cells, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21**, 308 (1993).
94. M. Chitsaz, M.H. Brown, The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance, *Essays Biochem.*, **61**, 127 (2017).
95. L. Zhibin, C. Yumei, C. Yufan, C. Yingying, Z. Lianhui, RND efflux pump and its interrelationship with quorum sensing system, *Yi Chuan.*, **38**, 894 (2016).
96. C. Costa, P.J. Dias, I. Sá-Correia, M.C. Teixeira, MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: do they have real clinical impact?, *Front. Physiol.*, **5**, 197 (2014).
97. H. Lage, ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22**, 188 (2003).
98. Y.J. Chung, M.H. Saie Jr, SMR-type multidrug resistance pumps, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **4**, 237 (2001).
99. J. Handzlik, A. Matys, K. Kieć-Kononowicz, Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*, *Antibiotics (Basel)*, **2**, 28 (2013).
100. Y. Miyamoto, D.F. Balkovetz, V. Ganapathy, T. Iwatsubo, M. Hanano, F.H. Leibach, Effects of phenothiazines on the Na⁺-H⁺ exchanger of the brush-border membrane from the proximal small intestine of the rabbit, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 823 (1988).
101. X. Roucou, S. Manon, M. Guérin, Investigations of the inhibitory effect of propranolol, chlorpromazine, quinine, and dicyclohexylcarbodiimide on the swelling of yeast mitochondria in potassium acetate. Evidences for indirect effects mediated by the lipid phase, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 353 (1995).

102. M. Toth, H. Frase, N.T. Antunes, C.A. Smith, S.B. Vakulenko, Crystal structure and kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase-2"-Iva, *Protein. Sci.*, **19**, 1565 (2010).
103. K.T. Madsen, M.N. Skov, S. Gill, M. Kemp, Virulence Factors Associated with *Enterococcus Faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Open Microbiol. J.*, **11**, 1 (2017).
104. J. Molnar, I. Mucsi, P. Kasa, Inhibition of the adhesion of *E. coli* on cultured human epithelial cells in the presence of promethazine or imipramine, *Zentralbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg.*, **254**, 3883 (1983).
105. J. Molnar, K. Csiszar, E. Czironk, E. Szollosy, Adhesion properties of *E. coli* cells in the presence of promethazine, *Zentralbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg.*, **266**, 276 (1987).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

W.G. Lima, M.C. Ramos-Alves, A.C. Soares, Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 5-28 (2019).

Utilização dos métodos automáticos em fluxos com detecção espectrofotométrica na determinação de diclofenaco de sódio em formulações farmacêuticas e fluidos corporais

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, Victor Elias Mouchrek Filho², Rayone Wesly Santos de Oliveira², Adriana Pereira Everton², Jonas Batista Reis², Hilton Costa Louzeiro³, Wellington da Silva Lyra⁴, Maria Alves Fontenele⁵, Danila Teresa Valeriano Alves⁶

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Abaetetuba, Pará, Brasil.

* Correio eletrônico: prbgomes@yahoo.com.br

²Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleo Essenciais, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

³Coordenação de Licenciatura em Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro, Maranhão, Brasil.

⁴Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

⁵Laboratório de Cereais, Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão-Campus Avançado, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

⁶Universidade Federal do Pará, Campus Cametá, Pará, Brasil.

Recebido em: 2 de abril de 2018

Aceito em: 21 de novembro de 2018

RESUMO

Este trabalho descreveu e comparou quatro estudos entre si que utilizaram métodos automáticos em fluxo com detecção espectrofotométrica e a reação de oxidação do diclofenaco para determinar diclofenaco em formulações farmacêuticas e fluidos corporais. Para isso, utilizamos os seguintes artigos: *Versatility of a multicommutated flow system in the spectrometric determination of three analytes*, *Sequential injection spectrophotometric method for the assay of anti-inflammatory diclofenac sodium in pharmaceutical preparations*, *Screening of conditions controlling spectrophotometric sequential injection analysis* e *Sequential injection spectrophotometric determination of diclofenac in urine and pharmaceutical formulations* e detalhamos as metodologias empregadas, os resultados, conclusões obtidas e comparamos entre eles os limites de detecção, desvio padrão relativo e a frequência analítica. Os resultados mostraram diferenças significativas entre métodos empregados e a utilização do Sistema automático do tipo Análise por Injeção Sequencial, apesar deste possuir menor frequência analítica.

Palavras-chave: FIA-multicomutação, análise por injeção sequencial, espectrofotometria, diclofenaco de sódio, oxidação.

SUMMARY

Use of automatic methods in fluxes with spectrophotometric detection in the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and body fluids

This study described and compared four studies that used automatic flow methods with spectrophotometric detection and the oxidation reaction of diclofenac to determine diclofenac in pharmaceutical formulations and body fluids. For this, the following articles were used: *Versatility of a multicommutated flow system in the spectrophotometric determination of three analytes*, *Sequential injection spectrophotometric method for the assay of anti-inflammatory diclofenac sodium in pharmaceutical preparations*, *Screening of conditions controlling spectrophotometric sequential injection analysis* and *Sequential injection spectrophotometric determination of diclofenac in urine and pharmaceutical formulations* and we detail the methodologies used, the results, the conclusions obtained and compare the limits of detection, relative standard deviation and analytical frequency. The results showed significant differences between the employed methods and the use of the Automatic System of the Sequential Injection Analysis type, although this one has a lower analytical frequency.

Key words: FIA-multicomutation, sequential injection analysis, spectrophotometry, sodium diclofenac, oxidation.

INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo biológico no qual o organismo libera substâncias químicas frente a uma lesão celular física (trauma ou queimadura), biológica (invasão por microrganismos ou mesmo quando o próprio organismo reconhece suas próprias células como invasoras) ou química (decorrentes de substâncias ácidas ou básicas) [1].

Um dos fármacos mais prescritos no combate à dor e a inflamação é o diclofenaco de sódio, cujo nome oficial é 2 - [(2,6-diclorofenil) amino] benzeno acetato de sódio. Este fármaco pertence à classe farmacológica dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), onde atua no organismo inibindo a enzima ciclo-oxigenase, no qual é responsável pela transformação do ácido araquidônico em Prostaglandina G2 [2]. Quanto a forma de administração no organismo, este fármaco é administrado por via oral (com-

primidos e cápsulas), parenteral (injetável), oftálmica, retal (supositório) e dermatológica (gel) [1].

Como todo medicamento, o diclofenaco ao ser administrado no organismo apresenta uma série de efeitos colaterais, dentre os mais relatados são: os efeitos gastrointestinais, dor de cabeça, tontura, edema e lesão que pode ser hepática ou renal, sendo em alguns casos, as úlceras gástricas ou intestinais, úlceras hemorrágicas, insuficiência cardíaca e problemas de visão [2-4].

Dessa forma, levando-se em consideração aos efeitos colaterais desse medicamento e sua prescrição no tratamento da dor e inflamação, os laboratórios de análises utilizam os padrões de controle de qualidade para garantir a eficácia e a eficiência do uso desse medicamento pelos consumidores. Dessa maneira, para garantir isso, estes utilizam metodologias analíticas utilizados nas farmacopeias (metodologias oficiais), que na maioria delas, utiliza a titulação potenciométrica [1]. Entretanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens, tais como: resposta rápida e limitada que o eletrodo deve fornecer mediante as mudanças do potencial elétrico, homogeneização constante da solução, consumo excessivo de reagentes e uso de equipamentos especializados.

Por causa dessas limitações observados na metodologia oficial, os laboratórios de análises estão recorrendo aos métodos espectrofotométricos, devido ao baixo custo, rapidez e simplicidade [5]. O trabalho de revisão realizado por Gouda e colaboradores, no período de 1985 a 2008, descreveram a utilização dos métodos espectrofotométricos e espectrofluorimétrico na determinação de alguns AINEs e concluíram que esses métodos são regulares e muito utilizados na confirmação ou quantificação das substâncias de interesse [6].

Como os métodos espectrofotométricos são de baixo custo quando comparado a outros métodos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência ou eletroquímicos, a utilização deles com os analisadores automáticos em fluxo tem suas vantagens, que são: redução dos custos analíticos por via da diminuição do número de operadores envolvido e o consumo mínimo de reagentes e amostra [7], o que acaba gerando menos impacto ambiental, no que tange ao descarte desse fármaco. Dentre os analisadores automáticos em fluxo, o mais utilizado em escala industrial é o analisador por injeção sequencial [8].

Na determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas, as reações mais utilizadas são as de oxidação. Isso acontece devido as colorações que há entre o reagente e fármaco. Assim, observamos na literatura que os principais oxidantes utilizados na reação com o diclofenaco foram Ce(IV) , BrO_3^- , Fe(III) e MnO_4^- [9-14].

Portanto, diante do exposto e devido as vantagens do método espectrofotométrico e dos analisadores automáticos em fluxo, este trabalho descreveu quatro estudos que utilizaram, respectivamente, as reações oxidação do diclofenaco com permanganato em diferentes meios e sistemas automáticos em fluxo com detecção espectrofotométrica na determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas e fluidos corporais. Além disso, comparamos esses estudos entre si com a finalidade de mostrarmos qual deles foi mais vantajoso e o mais empregado.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, utilizamos dois critérios: métodos automáticos em fluxo e a reação de oxidação do diclofenaco com permanganato. Desses critérios, selecionamos os seguintes artigos: *Versatility of a multicommutated flow system in the spectrometric determination of three analytes*, *Sequential injection spectrophotometric method for the assay of anti-inflammatory diclofenac sodium in pharmaceutical preparations*, *Screening of conditions controlling spectrophotometric sequential injection analysis* e *Sequential injection spectrophotometric determination of diclofenac in urine and pharmaceutical formulations*. Desses estudos, descrevemos a metodologia utilizada em cada, os resultados e as conclusões obtidas. Em seguida, comparamos os sistemas automáticos a partir do limite de detecção, desvio padrão relativo e frequência analítica com a finalidade de verificar qual destes foi mais vantajoso. Portanto, antes da apresentação dos estudos, apresentaremos de forma breve e simples os conceitos de sistemas automáticos e sua importância nas análises farmacêuticas.

Métodos automáticos e a utilização destes nas análises farmacêuticas determinação de diclofenaco de sódio em formulações farmacêuticas e fluidos corporais

Atualmente, os laboratórios de análises estão interessados no desenvolvimento de metodologias que utilizam sistemas automáticos. As razões para a utilização desses sistemas estão: maior segurança do analista no manuseio de substâncias que oferecem riscos à saúde, redução de custos, baixo consumo de reagentes e amostras, execução de procedimentos em um menor intervalo de tempo, diminuição do esforço humano, melhora na precisão das análises etc. [15].

Contudo, os analisadores automáticos são classificados em três grupos: analisadores automáticos discretos ou em batelada, automáticos robotizados e automáticos em fluxo. Os analisadores automáticos discretos, ou em batelada, são versões mecanizadas de métodos clássicos manuais. Nestes, um sistema mecânico transporta a mistura reacional de amostra individualizada para o detector, onde as medidas são realizadas após o estabelecimento do equilíbrio físico e químico da reação de interesse, afim de alcançar a máxima sensibilidade analítica [16].

Já os automáticos robotizados são mimetizações robóticas dos procedimentos executados por um operacionalizador. Ou seja, este método automático utiliza um braço mecânico, controlado por um computador para executar as operações analíticas. No entanto, a desvantagem desse sistema está no custo elevado, alta complexidade mecânica e diversas limitações na realização de análises automáticas [17].

Por outro lado, os analisadores em fluxo processam amostra e reagente em fluxo contínuo. Dessa maneira, o primeiro sistema em fluxo foi desenvolvido por Leonard Skeggs [18] em 1957. Desde esse ano até os dias de hoje, esse sistema passou por uma série de transformações com objetivo de facilitar as operações analíticas, minimizar a intervenção humana e simplificar o sistema. Dentre estes sistemas temos: *análise em fluxo segmentado*, *análise por injeção em fluxo*, *análise em fluxo monossegmentado*, *análise por injeção sequencial*, *análise em fluxo com multicomutação* e *análise em fluxo-batelada* [9]. Devido ao crescente número de analisadores em fluxo desenvolvidos, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [19, 20] recomendou uma classificação de acordo com o processamento da amostra ou reagente(s) e da característica básica do sistema.

Apesar da diversidade de sistemas automáticos em fluxo, em 2015 Gomes e colaboradores[9] publicaram um artigo de revisão, descrevendo a origem, as vantagens e desvantagens desses sistemas. Além disso, os sistemas em fluxo mencionados possuem uma configuração básica. Ou seja, todos possuem um sistema de injeção, propulsão, mistura/reacção e detecção. A propulsão dos fluidos é feita através de uma bomba peristáltica, microbombas, bomba pistão ou por ação da gravidade. A injeção pode ser dada através de seringa, válvulas solenoides, válvulas rotatórias ou injetor proporcional. Sendo que esta última é responsável pela diferenciação dos sistemas automáticos citados [9]. A mistura, geralmente, ocorre em reatores que pode ser uma bobina helicoidal ou câmara de mistura. E por fim, a detecção pode ser dada de várias formas: espectrofotometria de absorção e emissão atômica, fotometria, potenciometria, voltametria, etc. [9]. A figura 1 mostra a configuração básica de todo sistema em fluxo.

Devido a evolução ocorrida nos sistemas automáticos em fluxo e as vantagens relacionadas a esses sistemas quanto a automação da manipulação de soluções com fluxo intermitente; minimização do consumo de reagentes e amostras; aumento da frequência de amostragem; simplicidade e baixo custo de instrumentação [22], em 2006 Pimenta e Colaboradores [5] e em 2007 Tzanavaras e colaboradores [8] publicaram um artigo de revisão mostrando a importância e eficiência dos sistemas de Injeção em Fluxo nas análises farmacêuticas. Para Tzanavaras e colaboradores os sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (FIA, em inglês) são divididos em três seções, que são: A primeira com sistemas FIA homogêneos e inclui métodos baseados em: medidas de Ultra Violeta diretos, interações dos metais com as drogas e as várias reações com formação de compostos coloridos; a segunda seção aborda os sistemas FIA heterogêneos e especificamente a

utilização de reatores em fase sólida e os sensores ópticos; a terceira parte da revisão é dedicada aos sistemas FIA com pré-tratamento (hidrólise, digestão e fotólise) das amostras [8].

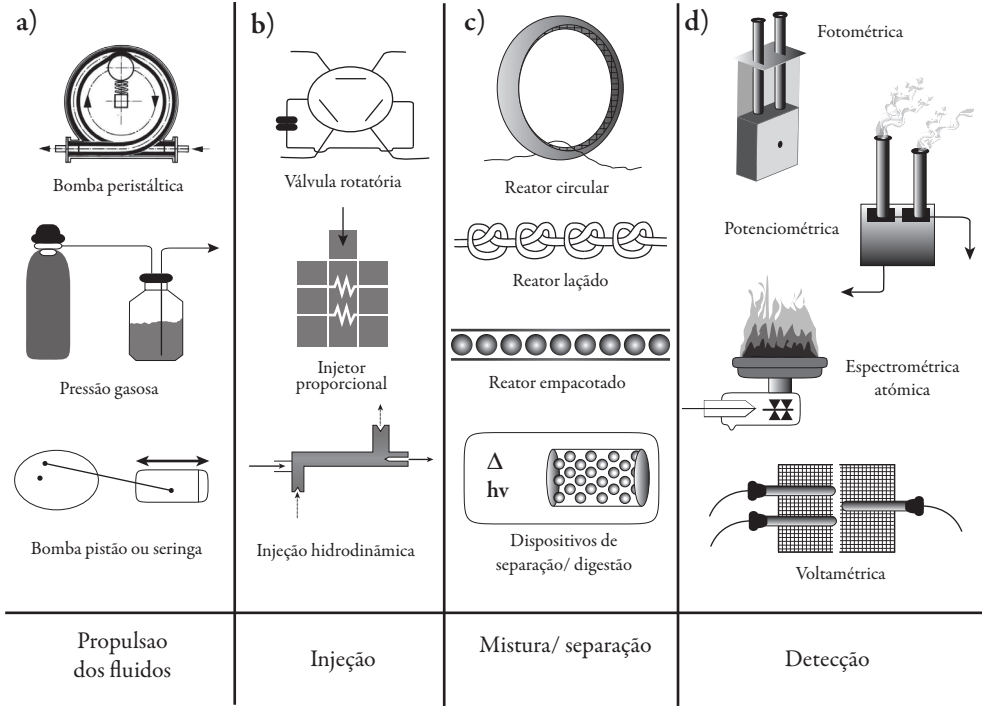


Figura 1. Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplos de sistemas de mistura e (d) exemplos de detectores.

Fonte: Adaptada da referência [21].

Avaliação dos métodos automatizados com detecção espectrofotométrica na determinação de diclofenaco de sódio em formulações farmacêuticas e fluidos corporais

A respeito do emprego dos sistemas automáticos com detecção espectrofotométrica e da reação de oxidação do diclofenaco com permanganato em diferentes meios e de forma direta, há três estudos que utilizaram o sistema em fluxo do tipo Analisador Sequencial e um que utilizou o sistema em fluxo multicomutado.

Em termos da utilização dos sistemas automáticos em fluxo e em escala cronológica, o primeiro estudo foi realizado por Rodriguez e colaboradores [12], publicado pelo periódico *Journal of Flow Injection Analysis* no ano de 2008, cujo título é: *Sequential injection spectrophotometric determination of diclofenac in urine and pharmaceutical for-*

mulations. Nesse estudo, a oxidação do diclofenaco com permanganato, de concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ocorreu em meio básico. Para isso, os autores prepararam uma solução de hidróxido de sódio com concentração de $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Além disso, os autores utilizaram o método Taguchi para parametrização experimental e o sistema automático do tipo Analisador por Injeção Sequencial (SIA, em inglês).

Nesse tipo de sistema automático, os autores utilizaram uma seringa como injetor e uma válvulas seletora de multiposição ou multiportas, sendo esta controlada pelo computador que utilizou o programa *Autoanalysis 5.0*. A etapa inicial realizada nesse sistema consistiu na injeção de uma alíquota de amostra de 0,5 mL que foi aspirada da porta 2 para dentro da bobina de retenção, ocorrendo em seguida o direcionamento desta mesma alíquota para a porta 4, com a finalidade de limpar o sistema. Essas etapas foram repetidas quando a amostra foi alterada. Uma vez que o tubo de amostra foi preenchido, 0,12 mL do conteúdo foram aspirados em direção ao reator (R1) juntamente com 0,12 mL de solução de permanganato $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (porta 1) (ambas as taxas de aspiração de $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); a mistura ocorreu no reator 2 (R2). A mistura foi transportada através da porta 3 para o detector a uma taxa de fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 2 min. O sinal foi monitorado a 445 nanômetros (nm) no espectrofotômetro UV vis do modelo Lambda 40, marca Perkin-Elmer. Após o dimensionamento do sistema, o método empregado foi comparado com o descrito nas análises farmacêuticas, que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou HPLC (*High performance liquid chromatography*), para validação dos resultados. A figura 2 mostra o esquema do sistema automático utilizado pelos autores.

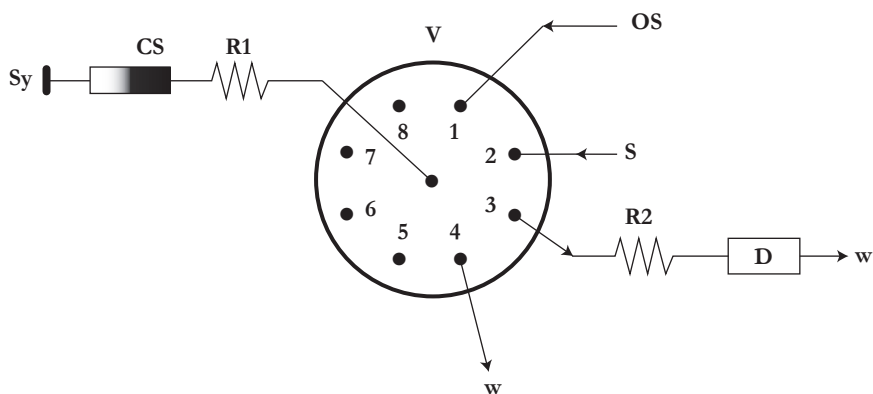


Figura 2. Diagrama esquemático do trabalho realizado por Rodrigues e colaboradores. (Sy) seringa, (CS) solução carregadora, (R1) reator 1, (V) válvula seletora, (OS) oxidação da solução de Permanganato (S) amostra, (R2) reator da mistura, (D) detector espectrofotométrico, 455 nm, (W) descarte. Fonte: adaptada da referência [12].

A partir desse sistema, os parâmetros avaliados foram: a influência sobre o sinal analítico do comprimento do reator (com comprimentos de 60, 90 e 120 cm), o volume aspirado (volume de permanganato e o volume da amostra – com volumes de 60, 90 e 120 microlitros) e a taxa de fluxo (com taxas de 0,50; 0,75 e 1,0 mL·min⁻¹); já a matriz ortogonal (L₉) utilizada foi 3⁴, resultando em 81 experimentos para os três níveis avaliados e as medições realizadas em soluções de diclofenaco, de concentração 50 mg·mL⁻¹ para diferentes tempos de armazenamento.

Os resultados obtidos foram estatisticamente calculados, utilizando-se o programa ANOVA-TM, no qual apresentou um valor de variância 3,17 para um nível de confiança 95% (valor da razão da variância/ valor da razão da variância crítica).

Por outro lado, os resultados obtidos a partir do dimensionamento do sistema mostraram que sob condições ideais, o intervalo linear da curva de calibração variou 10,0-100,0 mg·L⁻¹ com um limite de detecção de 5,0 mg·L⁻¹, taxa de amostragem de 15 determinações por h⁻¹, desvio padrão relativo da repetibilidade analítica menor que 3,0%. A partir disso, o estudo das análises da amostra revelaram que não houve diferenças significativas do método proposto pelos autores com o método de referência, isso quando se empregou o teste T, no qual foi obtido um valor de 2,78 a partir da comparação do t calculado com o t tabulado para um nível de confiança de 95%. Logo, segundo os autores o método automático possui uma enorme vantagem em relação ao método de referência, pois este é preciso e menos intensivo de mão-obra.

O segundo estudo foi realizado por Sutan e colaboradores [23] e este foi publicado dois anos após os estudos de Rodriguez e colaboradores. Nesse estudo, os autores realizaram a oxidação do diclofenaco com permanganato, acidificado a pH 6,0 e uma solução de ácido sulfúrico com concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ mol·L⁻¹. Dessa forma a reação entre o analito e o reagente ocorreu em meio ácido. Além disso, o autor dividiu o procedimento da análise no sistema automático em fluxo em passos, que foram, inicialmente: processo de injeção sequencial, utilizou uma seringa de 5 mL (SP) para realizar operações de aspiração e dispensação. O permanganato de potássio (R) foi ligado à válvula de seleção através da porta 2, as soluções padrão de diclofenaco foram preparadas na faixa de 20 a 250 mg·L⁻¹ e ligadas à válvula seletora através das portas 3, 4, 5, 6 e 7, enquanto a concentração desconhecida do analito, que geralmente é a solução de comprimidos, foi ligada à válvula seletora através da porta 8.

As tubulações foram carregadas com os respectivos reagentes por uma corrida de aspiração. A bomba da seringa foi preenchida com água acidificada como solução transportadora dirigindo a válvula de duas vias para o modo (na posição). Foram dispensadas 500 µL da solução carregadora de água acidificada para lavar a bobina de retenção,

bobina de reação, a célula em fluxo e ajustou-se a absorvância do espectrofotômetro a zero. Após isso, a uma taxa de fluxo de $50 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$, foram aspirados sequencialmente $50 \mu\text{L}$ de permanganato de potássio, $50 \mu\text{L}$ do fármaco para dentro da bobina de retenção. Dessa maneira foi realizado um curto curso reverso para permitir que todos os reagentes se misturem em um fluxo de $5 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$, seguido de distribuição contínua em direção ao detector por 30 segundos para ser registrado a absorvância. Assim, esses passos foram repetidos, mas aspirando a amostra do medicamento das outras portas da válvula seletora. Dessa forma, a concentração desconhecida da solução de diclofenaco foi registrada diretamente no software FIA Lab.

Logo, os parâmetros otimizados por esses autores, que incluiu calibração univariada, foram: a concentração do permanganato e a taxa de fluxo. Vale ressaltar que essa reação foi monitorada em 450 nm. Os resultados mostraram que a curva de calibração foi linear no intervalo de 30 a $135 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ com limite de detecção $0,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, limite de detecção em $0,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e sem resultados da frequência analítica. Após esse dimensionamento, os autores realizaram o estudo nas amostras e compararam os resultados obtidos com a metodologia adotada pela *Farmacopeia Britânica*, no qual não mostrou diferenças significativas quando se utilizou o teste t-pareado.

Em 2011, o periódico *Chemistry Central Journal* publicou o estudo realizado por Idris Abubakr [11]. Este estudo baseou-se no planejamento fatorial da reação do diclofenaco com permanganato de potássio em meio ácido. O planejamento fatorial utilizou dois níveis, máximo e mínimo, e seis fatores, que foram: a taxa de fluxo (flow rate), concentração do permanganato, concentração do ácido sulfúrico, volume do permanganato, volume do ácido sulfúrico e volume da amostra, totalizando assim 64 experimentos. Além disso, o autor estudou a sensibilidade, a rapidez e o consumo do reagente. O objetivo do planejamento fatorial utilizado pelo autor consistiu em otimizar o sistema para determinar o diclofenaco em gel, comprimido e soluções injetáveis. Já a reação, baseou-se na oxidação do diclofenaco com permanganato em meio a ácido sulfúrico e monitorado em 450 nm.

De acordo com o autor foi possível determinar esse analito nessas matrizes. Os resultados do estudo mostram que taxa de fluxo de $15 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$, concentração de permanganato $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, concentração de ácido sulfúrico de $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, volume de permanganato de $50 \mu\text{L}$, o volume ácido de $60 \mu\text{L}$ e o volume da amostra $60 \mu\text{L}$ registraram a maior resposta em 1,87. O autor também comenta que para taxa de fluxo inferior a $15 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ há uma diminuição na frequência da amostra e superior a $30 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ a diminuição na repetibilidade do sinal analítico.

Além disso, os resultados mostraram a linearidade na faixa de concentração de 10 a 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, limites de detecção e quantificação em 1,37 e 4,57 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, desvio padrão relativo para repetibilidade e precisão em 1,34 e 2,75 %, respectivamente e sem determinação para frequência analítica. Após isso, o método foi aplicado na determinação de diclofenaco em amostras de comprimidos, gel e injetáveis e comparado com a metodologia adotada pela farmacopeia britânica, no qual mostrou que não houve diferenças significativas no método proposto.

Segundo o autor, a justificativa pelo uso do planejamento fatorial na análise desse estudo resultou na insuficiência bibliográfica que utilizaram o mesmo, na incapacidade de avaliar as interações entre as condições que são mantidos constantes e no enorme tempo e consumo de reagentes das análises univariada. Além disso, o autor defende a ideia que este trabalho foi pioneiro nas análises em fluxo na região do espectro eletromagnético visível.

Observando a existência de poucos trabalhos realizados na determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas, Gomes e colaboradores [24] adaptaram a reação de oxidação do íon diclofenaco com permanganato de potássio em meio ácido para o sistema de análise de injeção em fluxo com multicomutação.

Esse sistema foi desenvolvido por Boaventura Reis e permite a inserção de pequenas alíquotas da amostra e do reagente de forma consecutiva e alternada, originando uma amostragem binária. Essa formação de zonas reacionais favorece o processo de homogeneização entre a amostra e o reagente, não influenciando na velocidade analítica [22]. O módulo de análise é constituído por um conjunto de válvulas solenoides que são acionadas por um acionador válvulas ou interface eletrônica que são controladas pelo microcomputador. Com um recurso como este é possível controlar a inserção precisa dos volumes de reagentes e amostra apenas pelo tempo de acionamento e um canal de bombeamento. Outra questão observada está no controle do software de acordo com o procedimento analítico no qual é possível fazer alterações somente no mesmo sem alterar a estrutura física do sistema [22].

Dessa maneira os autores utilizaram um sistema automático em fluxo com três válvulas solenoides do tipo três vias. Os comutadores independentes foram submetidos pela linguagem escrita Quick Basic 4.5, controlando os fluxos de amostra e reagentes permitindo, assim, comutar (redirecionar) os fluxos e, portanto, flexibilizar o sistema para formas totalmente automatizadas. Assim, no início, o sistema estava configurado e todas as válvulas estavam desligadas, permitindo apenas o transporte da solução transportadora (CA) que foi aspirada através da válvula V3 (linha cheia) em direção ao detector, formando a linha de base.

Na sequência, as válvulas V1, V2 e V3 são ligadas, sendo que as duas últimas são acionadas de forma alternadas, permanecendo V3 continuamente acionada, até o fim do número de ciclos de acionamento definidos (ver diagrama de tempo), quando, então, todas as válvulas serão desligadas. Essa sequência de eventos insere alternadamente (na figura 3 corresponde a AB) no percurso analítico as quantidades definidas de soluções de amostra e reagente, as quais são direcionadas à zona de confluência e uma bobina helicoidal (reator). A figura mostra a configuração básica do sistema.

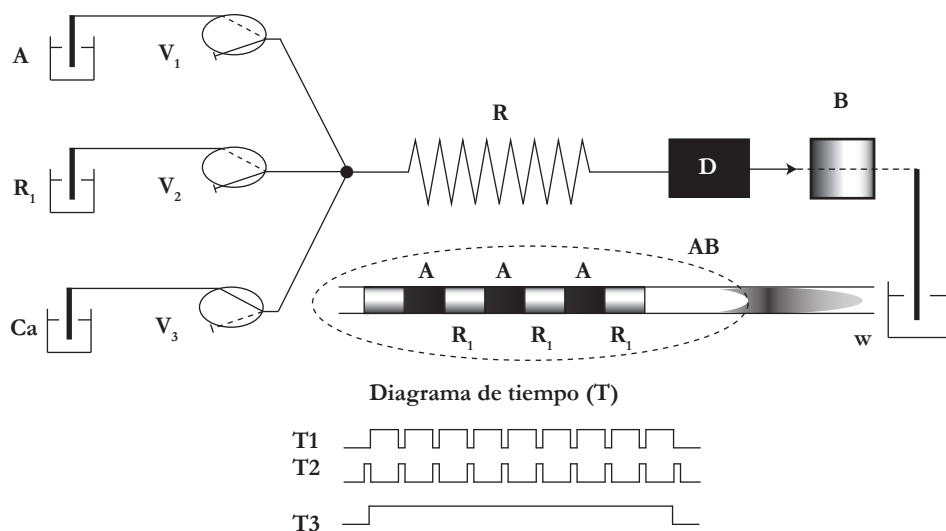


Figura 3. Módulo de análise do sistema em fluxo por multicomutação com válvulas solenoides por aspiração para determinar diclofenaco em formulação injetável. V1, V2, V3: válvulas solenoides; A: amostra (diclofenaco); R1: reagente (permanganato de potássio 4×10^{-4} Mol. L⁻¹); Ca: carregador (água deionizada); B: bomba peristáltica; R: reator; D (detector): espectrofotômetro; AB: amostra binária; T1: tempo de acionamento da válvula V1; T2: tempo de acionamento da válvula V2; T3: tempo de acionamento da válvula V3; W: descarte.

Fonte: Adaptado da referência [26]

Dessa forma, a reação foi monitorada em 465 nm, e foram avaliados e otimizados os parâmetros necessários para determinar o diclofenaco de sódio em formulação injetável, empregando-se o método univariado para verificar quais foram os melhores sinais analíticos. Os parâmetros avaliados foram: vazão, o número de ciclos, bobina da reação (reator), estudo da concentração do reagente, tempo de inserção do reagente e o tempo de inserção da amostra.

Os resultados desse estudo mostraram a faixa linear de concentração de 20-80 mg·L⁻¹, limites de detecção e quantificação estimados em 0,10 e 0,33 mg·L⁻¹ respectivamente, desvio padrão de 0,6% (n = 20) e taxa de amostragem de 80 determinações com por hora. A modelagem estatística utilizada foi o teste T pareado. E de acordo com os cálculos realizados, o T calculado (4,02) foi menor que o T crítico (4,30), levando-se em consideração o nível de confiança de 95% para o número de três amostras. Em vista desse resultado, pode-se concluir não houve diferenças significativas entre os métodos. Ressaltando-se que o autor comparou o método proposto com a farmacopeia brasileira, no qual realiza determinações espectrofotométricas do tipo direta.

A tabela 1 mostra o resultado comparativo dos métodos descritos nesse trabalho. E de acordo com essa tabela, pode-se observar que o método FIA multicomutação apresentou limite de detecção e desvio padrão relativo (RSD%), para o estudo de repetibilidade, menor que aqueles que são descritos nos outros trabalhos. Outra questão observada está na elevada frequência analítica do método FIA multicomutação quando comparado com a frequência analítica descrita por Rodrigues e colaboradores. Com esta observação pode-se concluir que o sistema FIA multicomutação possui frequência analítica maior do que o sistema SIA, o que torna esse sistema um pouco desvantajoso.

Embora o sistema SIA tenha uma baixa frequência analítica devido ao sistema de injeção ser dada de forma sequencial, o sistema automático em fluxo do tipo multicomutação apresenta como principal desvantagem as características operacionais das válvulas solenóides, nomeadamente uma inferior robustez. A ativação de uma válvula solenóide durante um período de tempo prolongado leva a um aquecimento da válvula, o que pode conduzir à deformação do teflon das membranas internas, causando assim a sua inutilização [25].

Tabela 1. Resultado comparativo do método proposto em fluxos.

Figuras de mérito	Sultan e colaboradores [23].	Abubakr [11].	Rodriguez e colaboradores [12]	Gomes e colaboradores [24]
Lineradidade (mg·L)	10-150	30-135	10-100	20-80
Limite de Detecção/ (mg·L)	1,37	0,24	5,0	0,100
RSD (%)	1,3	1,5	2,9	0,6
Frequência h ⁻¹	Não determinado	Não determinado	15	80

CONCLUSÃO

A partir desse trabalho, concluímos que o emprego dos métodos automáticos em fluxo do tipo multicomutado e sequencial são eficazes na determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas e fluidos corporais e que embora sejam vantajosos quando comparados com outros métodos analíticos, entre eles há diferenças nos limites de detecção, desvio padrão relativo e frequência analítica. Dos quatro estudos o que apresentou melhores resultados foi o sistema multicomutado para os critérios de limite de detecção, desvio padrão relativo e frequência analítica. Além disso, concluímos também que dentre os métodos automáticos em fluxo citados, o mais utilizado foi o analisador em fluxo por injeção sequencial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsas concedidas pela FAPEMA e ao CNPQ.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. J.P. Famaey, The interest of intramuscular administration of NSAIDS (Editorial), *Revista Brasileira de Reumatologia*, **34**, 153-154 (1994).
2. R.T. Sane, R.S. Samant, V.G. Nayak, High performance liquid chromatographic determination of diclofenac sodium from pharmaceutical preparation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **13**, 1307 (1987).
3. B. Golcman, R. Golcman, L.G.M. Castro, M. Mizoguchi, Necrose Tecidual após injeção intramuscular de diclofenaco de sódio, *An. Bras. Dermatol.*, **66**, 65-69 (1991).
4. M. Giovannetti, A.C.M. Marcel, J.R.M. Borrelli, C.I. Ikejiri, N. Alonso, P.D. Bianco, Necrose tecidual: efeito colateral do diclofenaco de sódio, relato de casos e discussão da fisiopatologia, *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, **48**, 39-42 (1993).
5. A.M. Pimenta, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, M.J. Calatayud, Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40**(1), 16-34 (2006).

6. A. Gouda, I. Mohamed, E. Kotb, A.S. Amin, R. Sheikh, Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review, *Arabian Journal of Chemistry*, **6**(2), 145-163 (2013).
7. L.H.M.M. Santos, Análise automática de gentamicina por quimiluminescência. Porto: Universidade do Porto, 2008.
8. D.P. Tzanavaras, G.T. Demetrius, Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis, *Analytica Chimica Acta*, **588** (1), 1- 9 (2007).
9. P.R.B. Gomes, I.S. Barreto, L.L. Carvalho, H.A. Pinheiro, H.S. Lima, V.E.F. Moucherek, R.N. Fernandes, An approach of the historical aspects, the advantages and disadvantages of automated analyzers: analysis in segmented flow (SFA) the flow analyzer batch (FBA), *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **7**(10), 901-906 (2015).
10. M.S. Sultan, H.D. Mohamed, J. Abdulmuttalib, A.A., Nawal Sequential injection spectrophotometric method for the assay of anti-inflammatory diclofenac sodium in pharmaceutical preparations, *Journal Flow Injection Analysis*, **27**, 49 (2010).
11. M.I. Abubakr, Screening of conditions controlling spectrophotometric sequential injection analysis, *Chemistry Central Journal*, **5**, 9 (2011).
12. J.A. Rodriguez, G. Islas, M.E.P. Hernandez, E. Barrado, Sequential injection spectrophotometric determination of diclofenac in urine and pharmaceutical formulations, *Journal Flow Injection Analysis*, **25**, 39 (2008).
13. S. Sastry, A.R. Mohana Rao, & T.N.V. Prasad, Spectrophotometric analysis of diclofenac sodium and piroxicam and their pharmaceutical preparations, *Analytical letters*, **20**(2), 349-359 (1987).
14. B.V. Kamath & K. Shivram, Spectrophotometric determination of diclofenac sodium via oxidation reactions, *Analytical Letters*, **26**(5), 903-911 (1993).
15. M. Trojanowicz (Ed), Advances in flow analysis, Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
16. N.W. Barnett, C.E. Lenchon, S.W. Lewis, Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, **18**(5), 346-353 (1999).
17. I. Facchin, Extração líquido-líquido em sistema de fluxo monossegmentado, Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 1996.

18. L.T. Skeggs, An automatic method for colorimetric analysis, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**(3), 311-322 (1957).
19. F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagato, Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends, *Analytica Chimica Acta*, **468**, 119-131 (2002).
20. J.L. Burguera, M. Burguera, Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection - spectrometric methods, *Talanta*, **83**, 691-699 (2011).
21. M.B. Lima, Um Micro Flow-Batch para Determinação Fotométrica e Turbidimétrica de Taninos em Amostras de Chás, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2010, pp.14.
22. A.F. Lavorante, M.A. Feres, B.F. Reis, Multi-commutation in flow analysis: a versatile tool for the development of the automatic analytical procedure focused on the reduction of reagent consumption, *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, **39**, 631 (2006).
23. M.S. Sultan, H.D. Mohamed, J. Abdulmuttalib, A.A. Nawal, Sequential injection spectrophotometric method for the assay of anti-inflammatory diclofenac sodium in pharmaceutical preparations, *Journal Flow Injection Analysis*, **27**, 49 (2010).
24. P.R. Gomes, H.S. Lima, A.J.D. Lima, R.N. Fernandes, W.S. Lyra, F.A. S. Cunha, E.F. Silva, M.L.B. Ferreira, W.S. Lima, Versatility of a multicommutated flow system in the spectrometric determination of three analytes, *Rev. Virtual Quím.*, **9**(2), 563-574 (2017). DOI: 10.21577/1984-6835.20170033
25. V. Cerdà, Introducción a los métodos de análisis en flujo, SCIWARE, Palma de Maiorca, 2006.
26. C.M.I Córdova, Desenvolvimento de Sistema de Análise em Fluxo por Multicomutação para determinação de poluentes ambientais, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, R.W. Santos de Oliveira, A. Pereira-Everton, J. Batista-Reis, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M. Alves-Fontenele, D.T. Valeriano-Alves, Utilização dos métodos automáticos em fluxos com detecção espectrofotométrica na determinação de diclofenaco de sódio em formulações farmacêuticas e fluidos corporais, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 29-43 (2019).

Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli*

Adrian Urbina-Daza¹, Cira Anaya-Ortega¹, Maicol Ahumado-Monterrosa^{2,3}, Ricardo Gaitan-Ibarra¹, Jorge Anaya-Gil¹.

¹Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Cra 50 N° 29-11, Cartagena-Colombia.

²Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, Facultad de ingeniería, Programa de Tecnología en Producción industrial, CIPTEC, Cll 30 N° 30D-60, Cartagena-Colombia.

Correo electrónico: mahumedo@tecnocomfenalco.edu.co

³Universidad de Cartagena, Sede San Pablo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, GQCT, Cartagena-Colombia. Correo electrónico: mahumedom@unicartagena.edu.co

Recibido para evaluación: 20 de marzo de 2018

Aceptado para publicación: 22 de noviembre de 2018

RESUMEN

Se han utilizado herramientas computacionales para proponer moléculas derivadas de cefalosporinas con potencial actividad antibacteriana, frente a cepas de *Escherichia Coli*, con mayor afinidad como inhibidores de enzimas de unión a penicilinas y que a su vez disminuyan o no tengan afinidad por betalactamasas de espectro extendido. Se diseñaron 20 moléculas con base en la estructura molecular de la cefalosporina, las estructuras fueron optimizadas utilizando la teoría del funcional de la densidad, se calcularon descriptores moleculares de reactividad, de forma paralela se sometieron a acoplamiento molecular con las enzimas antes mencionadas. Las moléculas presentaron valores de energía de unión negativos, doce moléculas mostraron una orientación e interacciones favorables en el sitio activo de la enzima de unión a penicilinas y trece moléculas presentaron menor afinidad que el ligando nativo (cefotaxima) por la betalactamasa. Tres moléculas pueden considerarse como potenciales inhibidores de enzimas de unión a penicilinas resistentes y betalactamasas.

Palabras claves: Cefalosporinas, enzimas de unión a penicilinas, betalactamasa de espectro extendido, acoplamiento molecular.

SUMMARY

Theoretical study of compounds derived from cephalosporins with inhibitory activity potential front to penicillin binding proteins (PBP) and resistance to Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL) produced by *Escherichia coli*

Computational tools have been used to propose molecules derived from cephalosporins with potential antibacterial activity, against strains of *Escherichia Coli*, with higher affinity as inhibitors of penicillin-binding enzymes and which in turn decrease or do not have affinity for extended-spectrum beta-lactamases. 20 molecules were designed based on the molecular structure of the cephalosporin, the structures were optimized using the density functional theory, molecular descriptors of reactivity were calculated, and in parallel form they were subjected to molecular docking with the enzymes mentioned above. The molecules showed negative binding energy values, 12 molecules showed an orientation and favorable interactions in the active site of the penicillin binding enzyme and thirteen molecules had lower affinity than the native ligand (Cefotaxime) for betalactamase. Three molecules can be considered as potential inhibitors of binding enzymes to resistant penicillins and betalactamases.

Key words: Cephalosporins, penicillin binding protein, extended-spectrum beta-lactamases, molecular docking.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en uno de los grandes temores para la terapia antibiótica, fármacos que eran eficaces han caído en desuso debido a la rápida capacidad de mutación que tiene el sistema de resistencia bacteriana. Aunque los antibióticos beta-lactámicos aún siguen siendo considerados de primera elección en el tratamiento de algunos procesos infecciosos [1], es apremiante la búsqueda de nuevas alternativas que ofrezcan una mayor eficacia frente a estos microorganismos. Apoyando lo anterior, hemos considerado de interés realizar estudios computacionales que permitan llegar a propuestas sólidas para el diseño posterior de moléculas que puedan resultar de interés en el área de los antiinfecciosos.

En el grupo de los antibióticos betalactámicos, se encuentra la familia de las cefalosporinas [2], las que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana a través de la

inhibición competitiva de la enzima transpeptidasa, también llamada proteína de unión a penicilina (PBP), imposibilitando su mecanismo de acción catalítico en la unión y entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano, glucoproteína que le confiere la forma, rigidez y estabilidad a la membrana celular bacteriana [3]. Sin embargo, las bacterias en su mecanismo de resistencia involucran la ruptura del anillo betalactámico por la acción de las betalactamasas [4]. Ejemplo de lo anterior es la *E. coli* resistente a antibióticos tipo cefalosporinas por la producción de enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE), principal mecanismo de resistencia antibacteriana [5].

Las infecciones bacterianas por agentes etiológicos multiresistentes limitan el uso de los antibióticos betalactámicos, inconveniente que se acentúa con la reducción en el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antibiótica [6]. Por ello es necesario implementar otras alternativas terapéuticas que pueden ser poco eficaces conduciendo a aumentos en las tasas de morbilidad, así como en los costos hospitalarios [5]. Una posibilidad que puede contribuir a disminuir la magnitud del problema radica en el diseño de nuevos fármacos análogos estructurales de las cefalosporinas, que surjan de un estudio computacional que permita proponer moléculas que presenten alta afinidad para inhibir la enzima PBP y que disminuyan su afinidad por la enzima BLEE [7].

El objetivo de este estudio es proponer nuevos compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia Coli*, utilizando como estructura base cefotaxima (ver figura 1), con el propósito de seleccionar moléculas que presenten mayor afinidad como inhibidores de las enzimas PBP y a su vez disminuyan o no tengan afinidad por las enzimas BLEE; para la búsqueda de moléculas con dichas características, se realizó un estudio teórico de moléculas análogas de cefalosporinas con modificaciones estructurales en la cadena lateral 7-acilamino, como se ilustra en la tabla 1, la información se obtuvo de descriptores electrónicos que permitieron comprender la relación entre las estructuras de las moléculas propuestas, su reactividad y predecir su comportamiento en el mecanismo de acción antibacteriana. También se calcularon los valores de energía libre de unión por las proteínas PBP y BLEE y se identificaron las interacciones existentes entre cada uno de las moléculas propuestas y en el sitio activo de estas enzimas, diseñándose de esta manera compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad antibacteriana más efectiva y posibles candidatos teóricos para estudios de desarrollo de nuevos fármacos.

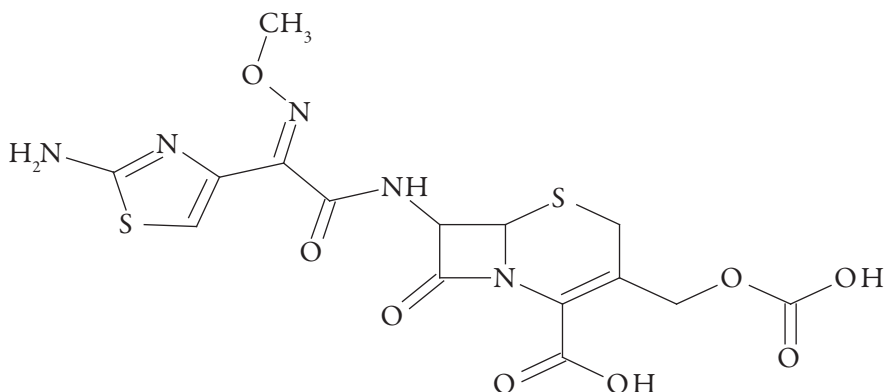


Figura 1. Estructura 2D cefotaxima.

METODOLOGÍA

La metodología de este trabajo se desarrolló en dos subsecciones: en una se describe como se calcularon los descriptores de reactividad a compuestos análogos de cefalosporina; en la otra sección se describe el estudio de las interacciones entre las moléculas propuestas y el sitio activo de PBP y BLEE de *E. coli* realizando cálculos de acoplamiento molecular.

Estudio teórico para calcular descriptores de reactividad a los 20 análogos de cefalosporina

Se diseñaron 20 moléculas (MP) con diferentes modificaciones estructurales, utilizando como molécula referencia la cefotaxima (MREF) (ver tabla 1), se utilizó el programa GaussView 5.0 [8], para la construcción de estas moléculas, y sus geometrías se optimizaron la teoría del funcional de la densidad (DFT) [9] a un nivel X3LYP [10] basado en el cálculo DGDZVP [11]. Una vez optimizadas las moléculas se procedió a realizar los cálculos energéticos de los orbitales moleculares HOMO y LUMO (orbitales frontera), para luego hallar la dureza y suavidad global. Todos estos cálculos se realizaron con el paquete de programas Gaussian 09 [12]. Por último se realizó el cálculo del mapa del potencial electrostático molecular (MEP) para los archivos de salida de las moléculas optimizadas empleando el programa Avogadro versión 1.0 [13].

Acoplamiento molecular y estudio de interacciones

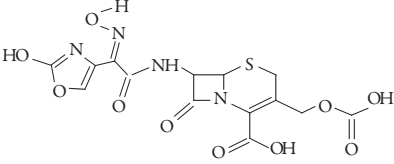
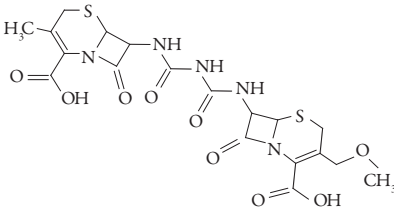
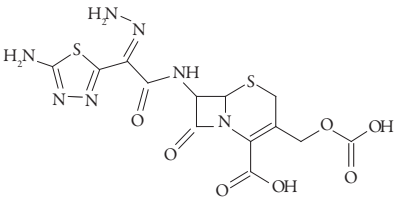
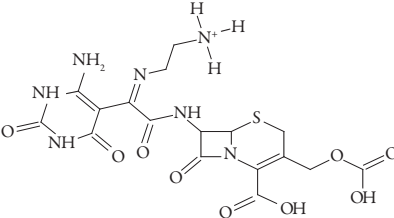
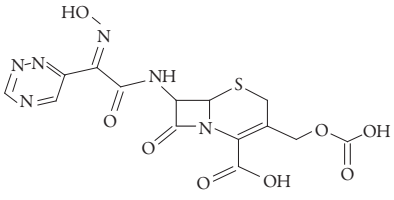
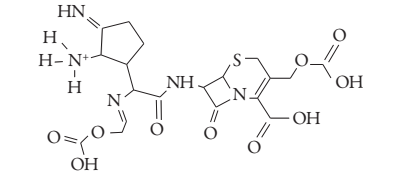
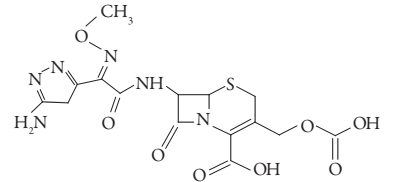
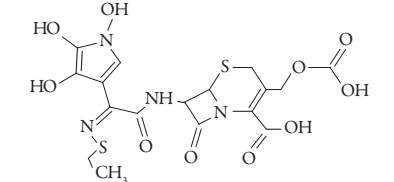
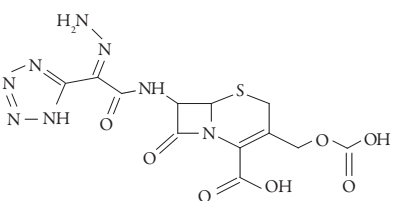
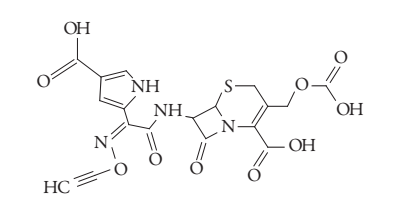
Preparación de proteínas y ligandos: la estructura 3D de la proteína PBP de una cepa de *E. coli* (PDB: 3MZE) en forma de complejo co-cristalizado con el ligando nativo cefoxitina (DB0133) y la estructura 3D de la BLEE (PDB: 3HLW) en forma de

complejo co-cristalizado con el ligando nativo cefotaxima (DB00493), se descargaron de la base de datos PDB (Protein Data Bank) [14]. Se visualizaron y se identificaron las proteínas con sus respectivos ligandos nativo en el sitio activo con el programa SYBYL-X v2.1 [15], de allí se extrajo la estructura del ligando nativo, luego se eliminando el agua y cofactores con presentes en los complejos cristalizados, y finalmente, se adicionaron todos los hidrógenos y se asignaron las cargas Gasteiger-Marsilli [16]. Por otra parte, el ligando nativo fue preparado en AutoDocktools v1.5.6 [17], se adicionaron los hidrógenos polares, e identificaron los enlaces rotables y las cargas de Gasteiger-Marsilli.

Los parámetros del acoplamiento con AutoDock v4.2 [18] fueron: para la proteína PBP, caja del Grid centrada en el sitio de unión del ligando nativo con un tamaño $51 \times 51 \times 51$ Å, con espaciado entre los puntos de 0,375 Å, generando 100 corridas por ligando; y para la proteína BLEE caja del Grid centrada en el sitio de unión del ligando nativo con un tamaño $41 \times 41 \times 41$ Å, con espaciado entre los puntos de 0,375 e igualmente estipulando 100 corridas por ligando. Los resultados de energía de unión son expresados en kcal/mol.

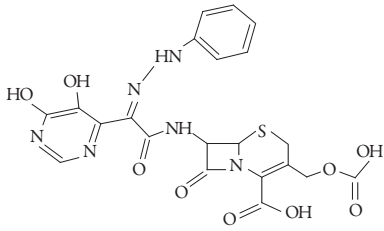
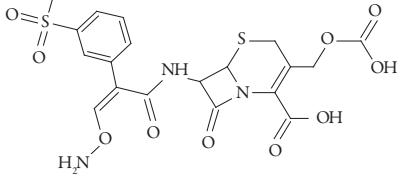
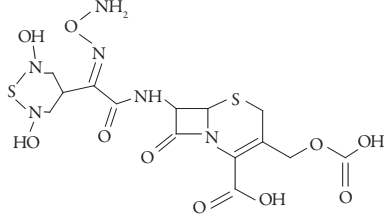
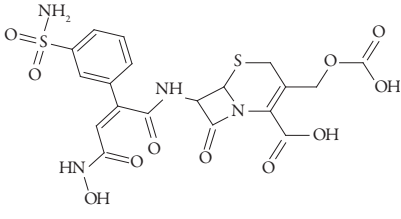
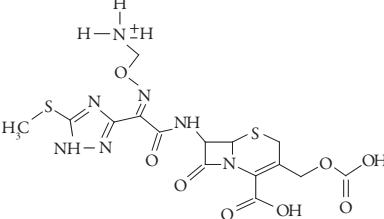
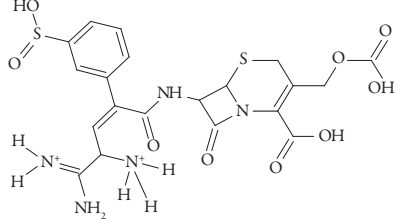
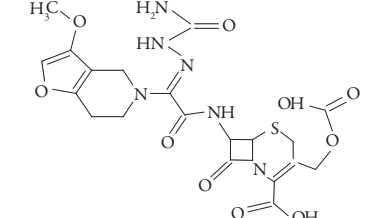
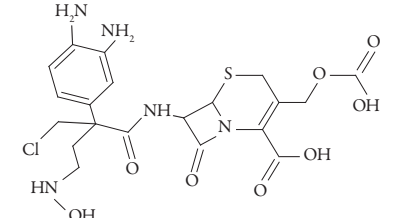
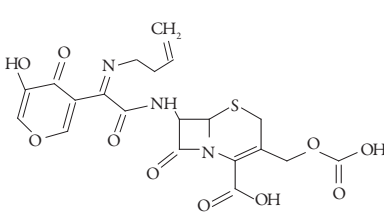
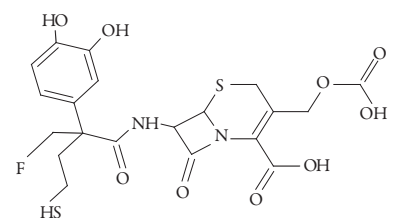
Los ligandos nativos previamente preparados se reacoplaron en sus respectivas proteínas, con el objetivo de validar los protocolos de acoplamiento. Se comparó la estructura cocrystalizada del ligando nativo versus la estructura acoplada en el sitio activo de la proteína y se utilizaron como criterios de validación la orientación en el sitio activo de los ligandos, la energía de unión y la desviación estándar cuadrática media (RMSD). Una vez el protocolo de acoplamiento molecular descrito arriba fue validado, de tal forma que la posición y orientación tomada por los ligandos en la estructura 3D, fue reproducida con cierta exactitud por *AutoDock* 4.2, los demás compuestos análogos de la cefotaxima fueron optimizados y acoplados siguiendo el mismo protocolo. Finalmente, se seleccionó como mejor conformación aquella que presentó la menor energía libre de unión. Adicionalmente se usó el programa Discovery Studio [19] para visualizar la mejor conformación para cada ligando, identificando la ubicación del farmacóforo y el tipo de interacciones proteína-ligando en el sitio activo de la enzima.

Tabla 1. Estructuras 2D de las moléculas de estudio.

ID	Estructura 2D	ID	Estructura 2D
MP1		MP11	
MP2		MP12	
MP3		MP13	
MP4		MP14	
MP5		MP15	

(Continúa)

Tabla 1. Estructuras 2D de las moléculas de estudio (*continuación*).

ID	Estructura 2D	ID	Estructura 2D
MP6		MP16	
MP7		MP17	
MP8		MP18	
MP9		MP19	
MP10		MP20	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sección de resultados y discusión se presenta de la siguiente manera: primero, se presentan los resultados de los descriptores de reactividad y el análisis de los mapas de potencial electrostático. Segundo, análisis de las interacciones resultado del acoplamiento molecular.

Descriptores de reactividad a los 20 análogos de cefalosporina

Teniendo en cuenta los efectos estéricos y electrónicos de los diferentes grupos sustituyentes sobre la reactividad del anillo betalactámico fue necesario un estudio de las propiedades electrónicas de estas moléculas. En la tabla 2 se muestran los cálculos energéticos de los orbitales fronteras HOMO y LUMO, dureza y suavidad global para las diferentes moléculas propuesta (MP) y la molécula de referencia (MREF). Se aprecia para la MREF (cefotaxima) una suavidad de 0,227 eV, que al compararse con la de las moléculas propuestas se concluye que MP2, MP6, MP9, MP11, MP13, MP14, MP19 y MP20 fueron las moléculas más suaves indicando que presentan mayor reactividad que la cefotaxima y tendencia a cambios en su población electrónica, actuando como moléculas nucleófilas o electrófilas.

Mientras que las moléculas MP1, MP3, MP4, MP5, MP7, MP8, MP10, MP12, MP15, MP16, MP17 y MP18 presentaron una dureza mayor que el valor de referencia calculado (2,203 eV), por lo que posiblemente presentarán menor reactividad con respecto a la cefotaxima. Las moléculas pareadas MP1 y MP17, MP5 y MP7, MP12 y MP15 no presentan cambios significativos en los valores de dureza y suavidad, posiblemente debido a que el ambiente químico alrededor de R es muy similar.

Tabla 2. Descriptores globales calculados para compuestos análogos de cefalosporinas a un nivel X3LYP/DGDZVP.

ID	Dureza (η)	Suavidad (S)	ID	Dureza (η)	Suavidad (S)
MREF (cefotaxima)	2,203	0,227	MP11	2,073	0,241
MP1	2,364	0,212	MP12	2,307	0,217
MP2	2,106	0,237	MP13	2,143	0,233
MP3	2,245	0,223	MP14	1,747	0,286
MP4	2,407	0,208	MP15	2,307	0,217
MP5	2,371	0,211	MP16	2,441	0,205
MP6	1,831	0,273	MP17	2,362	0,212
MP7	2,373	0,211	MP18	2,468	0,203
MP8	2,267	0,221	MP19	1,683	0,297
MP9	1,822	0,274	MP20	2,174	0,230
MP10	2,376	0,210			

Otra de las propiedades electrónicas calculadas fue el mapa de potencial electrostático (MEP), utilizado tradicionalmente en la interpretación cualitativa de la reactividad química pero que también es útil para analizar interacciones intermoleculares, debido a la identificación de regiones de potencial negativo, de alta densidad electrónica o zona nucleófila susceptible a ataque electrofílico; y de regiones o zonas de potencial positivo, de baja densidad electrónica susceptibles de ataque nucleofílico, es decir, zonas donde la molécula puede interactuar ganando electrones [20]. El potencial electrostático varía de zonas más negativas (rojo) a zonas más positivas (azul) de la siguiente manera: rojo, naranja, amarillo, verde y azul. Donde los colores intermedios indican un balance electrónico homogéneo, es decir zonas con baja densidad de carga [21].

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos del mapa de potencial electrostático molecular (MEP), para identificar las zonas de reactividad o zonas capaces de generar interacciones intermoleculares. Según los resultados mostrados en el mapa de potencial electrostático (MEP) de la figura 2, tanto el núcleo cefalosporánico como el sustituyente 3-acetoximetilo de dichas moléculas no presentan diferencias significativas en el potencial electrostático, con respecto a la MREF, por el contrario, los sustituyentes de la cadena lateral 7-acilamino para las MP presentan diferencias en los potenciales electrostáticos sobre estas zonas, demostrado por el cambio de colores observados en los MEP.

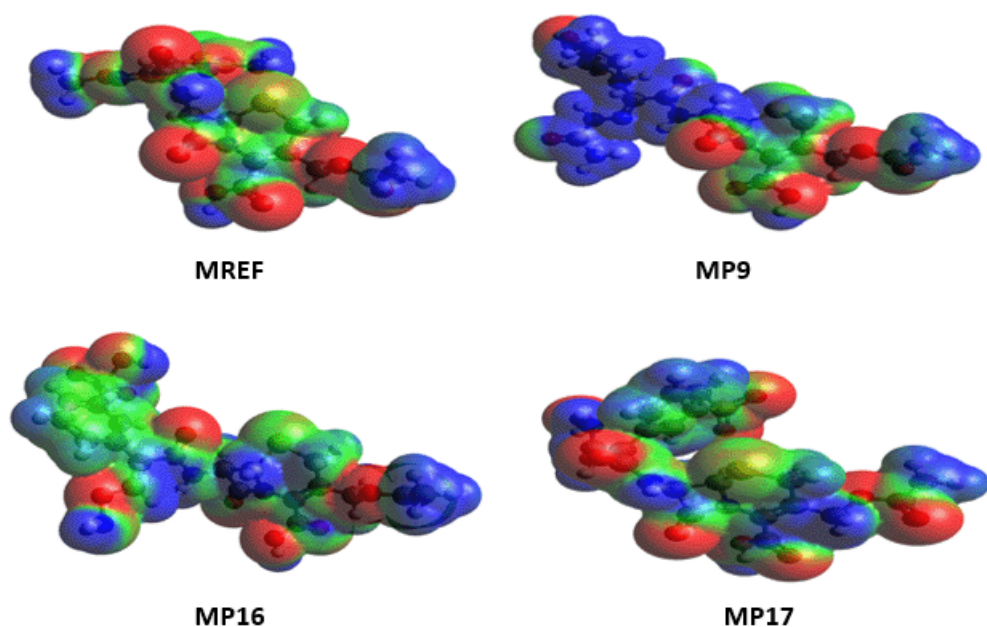


Figura 2. Mapa del potencial electrostático molecular (MEP) para las moléculas MREF, MP9, MP16 y MP17.

Para la molécula MP9 predominan grupos electrófilos en la cadena 7-acilamino, indicando que forman interacciones electrostáticas con grupos nucleófilos o donadores de electrones o alta formación de puentes de hidrógeno con grupos que presenten electrones libres, aun así, se observaron regiones con zonas de potencial negativo o de alta densidad electrónica. En el caso de la molécula MP16 se observa una gran zona verde, mostrando distribución electrónica homogénea o baja polaridad en los grupos sobre los que se observa ese potencial, prediciendo mayor facilidad para la formación de interacciones con residuos hidrofóbicos.

Por otro lado, la gran mayoría de las moléculas propuestas presentaron diversas zonas con potencial negativo y potencial positivo sobre la cadena 7-acilamino, es decir, zonas nucleófilas y electrófilas que crean una alta polaridad en la región, por lo que se favorecería la formación de diversas interacciones electrostáticas, ejemplo de una de ellas es la molécula MP17, donde las zonas de potencial negativo se encontraban sobre los oxígenos carboxílicos y enlazados a nitrógeno. Las zonas de potencial positivo se encontraban en cadenas alquílicas y sobre nitrógenos enlazados a átomos más electronegativos, esperando formación de interacciones con restos polares como puentes de hidrogeno. Por tanto, se infiere que estas moléculas tienen alta capacidad de formar interacciones electrostáticas con residuos de aminoácidos en el centro activo de las enzimas, favoreciendo acoplamiento ligando-receptor.

Acoplamiento molecular y estudio de interacciones

Según el alineamiento mostrado en la figura 3, siguiendo el criterio visual, se observa que la conformación resultado del *docking* se ubica en el sitio de unión de la PBP (PDB: 3MZE), tomando una conformación semejante a la que presenta el ligando nativo en su estructura cristalizada, igualmente ocurre en el sitio de unión de la BLEE (PDB: 3HLW). Según el criterio RMSD para ambas proteínas, se obtuvo un valor de 1,56 Å para la conformación de menor energía de unión, considerándose como una conformación aceptable [22]. Por lo tanto, se puede afirmar que AutoDock v4.2 reproduce adecuadamente la forma de unión y las interacciones presentes entre ligandos nativos y proteínas.

Posteriormente se llevó a cabo un segundo acoplamiento entre estas mismas moléculas y las enzimas BLEE y la enzima PBP con el fin de seleccionar aquellas que presenten baja afinidad donde su grupo farmacofórico no interacciona con los aminoácidos catalíticos del sitio activo, responsables del mecanismo de resistencia antibacteriana. Se observó que trece de las veinte moléculas presentaron menor afinidad teórica por la enzima, en comparación con el ligando nativo (cefotaxima), lo que supone menor susceptibilidad al mecanismo de resistencia y por tanto mayor eficacia antibacteriana [23], como se puede observar en la tabla 3.

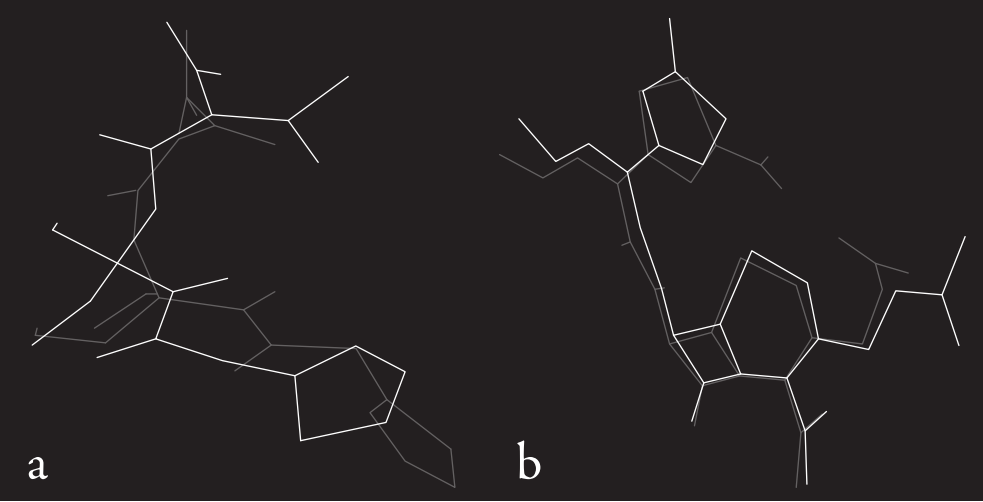


Figura 3. Alineamiento entre el ligando nativo presente en el complejo cocrystalizado (en color verde) y el ligando nativo resultante del acoplamiento molecular (en color rojo), utilizando el programa AutoDock v4.2. a) con la enzima PBP b) con la enzima BLEE.

Tabla 3. Afinidad (energía de unión) entre compuestos análogos de cefalosporinas y las enzimas PBP y BLEE.

ID	Afinidad PBP (kcal/mol)	Afinidad BLEE (kcal/mol)	ID	Afinidad PBP (kcal/mol)	Afinidad BLEE (kcal/mol)
Ligando nativo	-5,86	-7,23	MP11	-6,89	-6,9
MP1	-8,13	-7,23	MP12	-6,67	-6,81
MP2	-7,43	-6,83	MP13	-5,88	-7,0
MP3	-7,58	-7,43	MP14	-7,05	-6,68
MP4	-8,32	-8,13	MP15	-7,37	-7,03
MP5	-8,49	-7,7	MP16	-7,92	-6,21
MP6	-7,47	-7,25	MP17	-8,56	-6,44
MP7	7,79	-7,69	MP18	-7,17	-7,0
MP8	-7,14	-6,9	MP19	-7,15	-5,6
MP9	-7,93	-7,11	MP20	-6,5	-4,62
MP10	-7,06	-7,61			

Según los valores de energía de unión se consideran a las moléculas MP9, MP16 y MP17 como las de mayor afinidad por la enzima PBP y con menor afinidad por la enzima BLEE, como moléculas de interés para el estudio de la orientación del grupo farmacofórico y las interacciones entre el ligando y el sitio activo de las proteínas PBP y BLEE. En la figura 4 se muestran las interacciones presentadas entre las moléculas MP9, MP16, MP17 con la enzima PBP. Para MP9 se identifica la cercanía entre el resto nucleófilo del residuo catalítico SER44 y el grupo farmacofórico, demostrando correcta orientación en el sitio activo y por tanto mayor probabilidad de interacción nucleofílica.

Otros aminoácidos interactuantes son SER110, SER87, ASN112, ARG248, HIS216, LYS84, ASP154 Y LEU 153, caracterizándose interacciones en su mayoría tipo puente de hidrogeno y una interacción hidrofóbica. Para la molécula MP16 se muestra una situación similar, mostrando aproximaciones de los aminoácidos catalíticos SER87 y SER110 con el grupo farmacofórico, lo que posiblemente origina posteriores interacciones y con esto el ataque nucleofílico enzimático. Otros aminoácidos interactuantes son HIS151, LEU153, LYS84 y ARG248. En cuanto a MP17 se distingue que la orientación de la conformación no favorece las interacciones deseadas con el sitio activo de la enzima, sin embargo, se observa interacción con el residuo catalítico SER110 que conllevaría a un ataque nucleofílico con el grupo de interés; otras interacciones presentadas son del tipo puente de hidrógeno: HIS216, LYS47, LYS84, ASP218 y VAL82.

En la figura 5 se muestra las interacciones entre las moléculas MP9, MP16, MP17 con la enzima BLEE, donde se identifica que MP9 y MP16 no evidencian aproximación para interacción farmacofórica con los aminoácidos catalíticos del sitio activo (SER130, SER237 y SER274), lo que sugiere impedimento del ataque nucleofílico y con ello bloqueo de la interacción causante de la resistencia antibacteriana; estas moléculas adoptan orientaciones que favorecen la formación de interacciones de la cadena 7-acilamino con los restos del sitio activo, en lugar del farmacóforo o regiones cercanas al anillo betalactámico, Por el contrario la molécula MP17 presentó interacción favorable del grupo farmacofórico con el residuo SER274, produciendo la inactivación del anillo betalactámico, hecho que predispone a la aparición de resistencia antibacteriana.

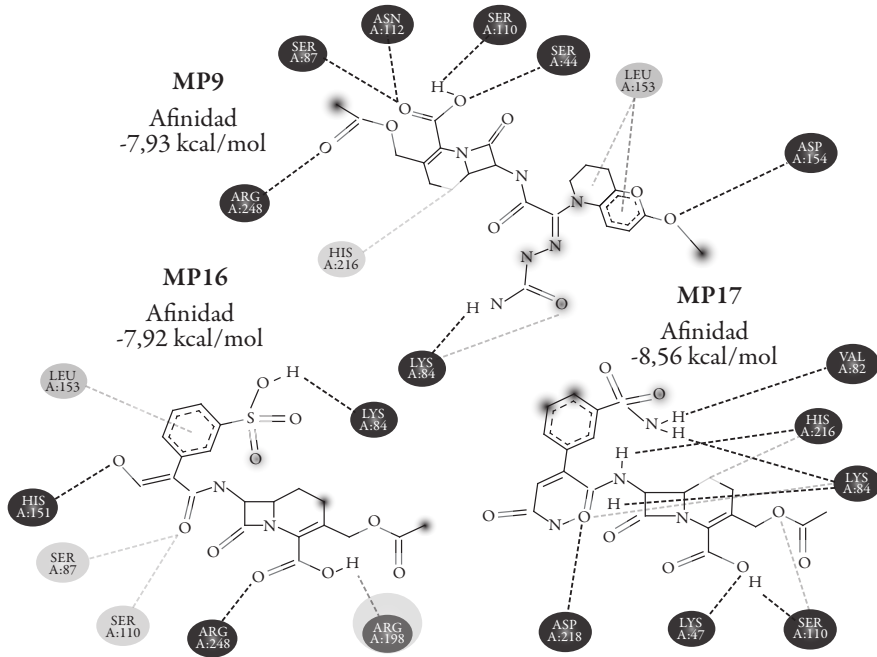


Figura 4. Interacciones presentes entre MP9, MP16 y MP17 y el sitio activo de la enzima PBP.

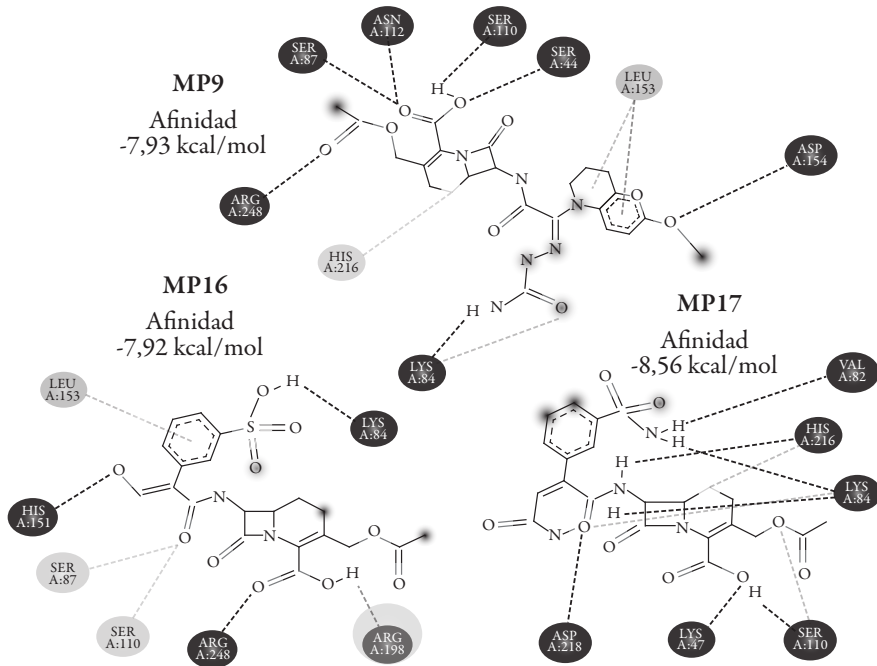


Figura 5. Interacciones presentes entre MP9, MP16 y MP17 y el sitio activo de la betalactamasa.

CONCLUSIONES

Los resultados de los cálculos de suavidad permiten concluir que las moléculas MP2, MP6, MP9, MP11, MP13, MP14, MP19 y MP20 fueron las más suaves indicando que presentan mayor reactividad que la cefotaxima cuyo valor de suavidad fue 0,227. Mientras que las moléculas MP1, MP3, MP4, MP5, MP7, MP8, MP10, MP12, MP15, MP16, MP17 y MP18 presentaron una dureza mayor que el valor de referencia calculado (2,203 eV), por lo que posiblemente presentarán menor reactividad con respecto a la cefotaxima.

El análisis de los mapas de potencial electrostático molecular permite inferir que estas moléculas tienen alta capacidad de formar interacciones electrostáticas con residuos de aminoácidos en el centro activo de las enzimas, favoreciendo acoplamiento ligando-receptor.

Los resultados obtenidos muestran que todas las moléculas presentaron mejores valores de afinidad por la enzima PBP, en comparación con el ligando nativo, mientras que 13 moléculas mostraron además menores valores de energía de unión por la enzima BLEE, de las cuales MP9 y MP16 presentaron el menor valor de energía de unión, por lo que se deduce dichas moléculas tienen posible resistencia a la enzima BLEE. Por último, se considera a las moléculas MP9, MP16 y MP17 como potenciales inhibidores de transpeptidasas y resistentes a BLEE producidas por *E. coli*, indicando que los grupos sustituyentes de estas moléculas son adecuados para el diseño de fármacos con mejor eficacia antibacteriana contra este microorganismo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo contó con la financiación de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Cartagena. El autor Jorge Anaya-Gil agradece a Colciencias por el programa Nacional para Formación Doctoral, Convocatoria 727-2015.

REFERENCIAS

1. F. Galván, J. Agapito, N. Bravo, J. Lagos, J. Tamariz, Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú, *Rev. Med. Hered.*, **27**, 22-29 (2016).
2. A.M. García-Hernández, E. García-Vázquez, A. Hernández-torres, J. Ruiz, G. Yagüe, J. Herrero, J. Gómez, Productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales, *Ver. Esp. Quimioter.*, **24**(2), 57-66 (2011).
3. C. Suárez, F. Gudiol, Antibióticos betalactámicos, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **27**(2), 116-129 (2009).
4. A. Zapun, C. Contreras-Martel, T. Vernet, Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 361-385 (2008).
5. C. García, L. Astocondor, C. Banda, Enterobacterias productoras de-lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú, *Acta Med. Per.*, **29**(3), 163-169 (2012).
6. N. Amado, H. Fajardo, R. Ramírez, G. Gloria, Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in gramnegative bacilli in a health institution of Tunja (Colombia) in 2013, *Salud Soc. UPTC*, **1**(2), 54-60 (2014).
7. J. Echevarria, D. Iglesias, Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos, *Rev. Med. Hered.*, **14**(4), 195-203 (2003).
8. R. Dennington, T. Keith, J. Millam, GaussView. Semichem Inc., Shawnee Mission KS (2009).
9. K. Burke, Perspective on density functional theory Perspective on density functional theory, *J. Chem. Phys.*, **136**(15), 150901-150919 (2012).
10. X. Xu, W.A. Goddard, The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(9), 2673-2677 (2004).
11. N. Godbout, D.R. Salahub, J. Andzelm, E. Wimmer, Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation, *Can. J. Chem.*, **70**(2), 560-571 (1992).

12. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, "Gaussian 09". Wallingford: Gaussian, Inc (2009).
13. M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro : an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics*, **4**, 1-17 (2012).
14. H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, J.L. Markley, The World Wide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 2006-2008 (2007).
15. Tripos International, Sybyl-X Molecular Modeling Software Packages, Version 2.0. Tripos Associates, Inc.: St. Louis, MO, USA (2012).
16. J. Gasteiger, M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron*, **36** (22), 3219-3228 (1980).
17. G. Morris, R. Huey, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.*, **30**(16), 2785-2791 (2009).
18. G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comp. Chem.*, **19**(14), 1639-1662 (1998).
19. Discovery Studio, version 2.5; Accelrys, Inc: San Diego, CA, USA (2009).
20. K. A. Ford, Role of electrostatic potential in the in silico prediction of molecular bioactivation and mutagenesis, *Mol. Pharm.*, **10**, 1171-1182 (2013).
21. V. Aramburu, M. López, H. Fasoli, Modelado de sistemas nanoestructurados como catalizadores de la reacción de la reducción de oxígeno, *Mecánica Computacional*, **34**, 2967-2980 (2016).
22. M. J. Ahumado, J. C. Drosos, R. Vivas-Reyes, Application of molecular docking and ONIOM methods for the description of interactions between anti-quorum sensing active (AHL) analogues and the *Pseudomonas aeruginosa* LasR binding site, *Molecular bioSystems*, **10**(5), 1162-1171 (2014).
23. L. Dhara, A. Tripathi, Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis, *Eur. J. Integr. Med.*, **5**(6), 527-536 (2013).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A. Urbina-Daza, C. Anaya-Ortega, M. Ahumado-Monterrosa, R. Gaitan-Ibarra, J. Anaya-Gil, Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 44-60 (2019).

Estudio fitoquímico de hojas de *Cavendishia compacta* (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria

Sorantly Paola Vasco Zamudio¹, William Fernando Castrillón Cardona¹, Javier Andrés Matulevich Pelaez^{1*}, Laura Ximena Díaz Barrera¹

¹Grupo de Investigación en Productos Naturales vegetales, Proyecto Curricular de Licenciatura en Química, Facultad de Ciencias y Educación, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Carrera 4 # 26 D - 54, Bogotá, Colombia.

*Correo electrónico: jamatulevichp@udistrital.edu.co

Recibido para evaluación: 31 de mayo de 2018

Aceptado para publicación: 26 de noviembre de 2018

RESUMEN

Se realizó el estudio fitoquímico de hojas de *Cavendishia compacta*. La separación de extractos y fracciones por cromatografías en columna, capa delgada y capa delgada preparativa, permitieron obtener una mezcla de diterpenos conformada por kaurano, rimuneno y biformeno; una mezcla de compuestos aromáticos constituida por acetofenona y benzaldehído; una mezcla de triterpenos constituida por α -amirina y β -amirina y el aislamiento de morina y miricetina. La actividad antiinflamatoria se evaluó al extracto etanólico y las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo, utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA, siendo el extracto etanólico y la fracción de diclorometano los que presentaron un efecto antiinflamatorio moderado de 49,3% y 39,8% respectivamente.

Palavras-chave: *Cavendishia compacta*, *Ericaceae*, actividad antiinflamatoria.

SUMMARY

Phytochemical study of leaves of *Cavendishia compacta* (Ericaceae) and evaluation of its anti-inflammatory activity

The phytochemical study of leaves of *Cavendishia compacta* was carried out. The separation of extracts and fractions by column chromatography, thin layer and preparative thin layer allowed to obtain a mixture of diterpenes consisting of kaurane, rimunene and biformene; a mixture of aromatic compounds constituted by acetophenone and benzaldehyde; a mixture of triterpenes constituted by α -amirine and β -amirin and the isolation of morine and myricetin. The anti-inflammatory activity was evaluated to the ethanolic extract and fractions of hexane, dichloromethane and ethyl acetate using the model of atrial edema induced by TPA, being the ethanolic extract and the fraction of dichloromethane those that presented a moderate anti-inflammatory effect of 49.3 % and 39.8% respectively.

Key words: *Cavendishia compacta*, Ericaceae, antiinflammatory activity.

INTRODUCCIÓN

Cavendishia compacta es un arbusto epifito de 4 metros de altura aproximadamente, con tallo estriado, glabro y de color café. Presenta hojas coriáceas y elípticas, su ápice es acuminado, glabro o con pelos dispersos a lo largo de la nervadura central [1]. Comúnmente es conocida como camarero grande; es una especie endémica de Colombia que se distribuye a lo largo de las laderas occidentales y estribaciones de la Cordillera Occidental, en el bosque húmedo, en elevaciones de 5-1800 m s.n.m. A esta especie se la da un uso ornamental, ya que hace parte de la vegetación de la zona y sus flores son de gran atractivo para las personas por su color vivo.

Aunque no existen reportes de sus estudios químicos, se han logrado identificar en el género *Cavendishia* flavonoides de diferentes tipos como: flavonas (luteolina, chrysoeriol y tricina), flavonoles como quercetina, kaempferol y miricetina, dihidroflavonoles y proantocianidinas. También se han reportado compuestos fenólicos como el ácido elágico y el ácido salicílico [2]. En *Cavendishia endresii* y *Cavendishia grandifolia* se ha reportado la presencia de resveratrol y estilbenos, en extractos de esta última especie se presentan derivados del ácido cinámico y en sus frutos, grandes contenidos de ácido clorogénico como constituyente químico más abundante en esta especie [3].

Es importante resaltar que, aunque Colombia posee gran número de especies pertenecientes al género *Cavendishia*, estas no cuentan con estudios químicos o biológicos reportados en la literatura, razón por la cual el presente trabajo se orientó al estudio químico de las hojas de la especie vegetal *Cavendishia compacta* y la evaluación de su actividad antiinflamatoria.

METODOLOGÍA

El material vegetal fue recolectado en el corregimiento Virolin, finca la Sierra, camino el Olival del municipio de Charalá, Santander, Colombia (Coordenadas geográficas: 6° 06' 31.0" N, 73° 11' 54.1" W). Una muestra testigo fue enviada al Herbario Nacional de Colombia para su determinación taxonómica la cual fue clasificada bajo el número de colección COL 574699 como *Cavendishia compacta*. Se tomaron (300 g) de hojas de la especie las cuales se secaron a temperatura ambiente y fueron reducidas de tamaño para su posterior extracción.

Obtención de extractos y fracciones

Las hojas una vez secas y trituradas en molino fueron sometidas a una extracción con etanol (EtOH) por el método de extracción soxhlet; el extracto obtenido (E.EtOH.H, 22,6 g) fue floculado con agua en relación 1:0,5mL y filtrado posteriormente. Al E.EtOH.H se le realizó un estudio fitoquímico preliminar [4] con el propósito de reconocer los posibles grupos de metabolitos presentes en el mismo. Para el fraccionamiento del E.EtOH.H se empleó el método de extracción líquido-líquido continuo con solventes de polaridad creciente obteniendo las fracciones de hexano (F.HEX.CcH, 9,57% p/p), diclorometano (F.CH₂Cl₂.CcH, 6,62% p/p), acetato de etilo (F.AcOEt.CcH, 22,64% p/p) y un residuo hidroalcohólico (R.H.CcH, 60,36% p/p).

Se tomaron 4 g de F.HEX.CcH y se fraccionaron por cromatografía en columna (CC) empleando como fase móvil hexano: cloroformo 6:4, obteniendo 8 fracciones. Las fracciones 1 (F.HEX.CcHF1) y 4 (F.HEX.CcHF4) fueron subfraccionadas nuevamente por CC. Para 0,66g de F.HEX.CcHF1 se empleó como fase móvil diclorometano: acetona 9:1, obteniendo 5 subfracciones. En las subfracciones 2 (F.HEX.CcHF1.2) y 4 (F.HEX.CcHF1.4) se obtuvo 9,2 mg de un sólido de color blanco denominado mezcla CcH1 y 21,6 mg de un sólido de color verde denominado mezcla CcH2, respectivamente. Para 0,60 g de (F.HEX.CcHF4) se empleó como fase móvil diclorometano: acetona 8:2, obteniendo 5 subfracciones. En la subfracción 1 (F.HEX.CcHF4.1) se obtuvo 30 mg de un sólido de color blanco denominado mezcla CcH3.

Se tomaron 0,07g de $F.CH_2Cl_2.CcH$ y se fraccionaron por CC empleando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo 1:1, obteniendo 10 fracciones. En la fracción 2 ($F.CH_2Cl_2.CcHF_2$) precipitó un sólido de color amarillo (87 mg) denominado compuesto CcH_4 y en la fracción 3 ($F.CH_2Cl_2.CcHF_3$) se obtuvo un sólido de color amarillo-verdoso (120mg) denominado compuesto CcH_5 .

A partir de 1g de ($F.AcOEt.CcH$) se fraccionó por CC empleando como fase móvil cloroformo: metanol 6:4, obteniendo 5 fracciones. La fracción 1 ($F.AcOEt.CcHF_1$), fue fraccionada por CC empleando como fase móvil cloroformo: metanol 7:3, obteniendo 12 subfracciones. En la subfracción 1 ($F.AcOEt.CcHF_{1.1}$) precipitó un sólido (40mg) de color amarillo-verdoso, este después de ser analizado resultó ser el mismo compuesto denominado CcH_5 .

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto y de las fracciones obtenidas se realizó mediante el ensayo in vivo de edema inducido en oreja de ratón por TPA, empleando 36 ratones albinos machos de 32 a 38 g, entre doce a catorce semanas de nacidos, mantenidos en condiciones estándar los cuales fueron suministrados por el Bioterio de la facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Se administró el irritante 13-acetato 12-tetradecanoilforbol (TPA, 2,5 μg /oreja) junto con indometacina 500 μg /oreja como patrón y la sustancia a evaluar ($E.EtOH.H$, $F.HEX$, CcH , $F.CH_2Cl_2.CcH$ y $F.AcOEt.CcH$ 500 μg /oreja) disueltas en $EtOH$ -acetona vía tópica en la oreja derecha (volumen total: 20 μL /oreja, 10 μL /cara), la oreja izquierda se empleó como control. Transcurridas 4 horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de cada pabellón auricular por sacabocado de 6mm de diámetro. Finalmente se calculó la diferencia de peso entre oreja tratada y no tratada expresando los resultados como porcentaje de inhibición del edema. Para el análisis se consideró como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65% [5]. Finalmente, se realizó un análisis estadístico de varianza de un solo factor, mediante el *software Minitab 16.2.3* seguido de una prueba Dunnett para comparaciones múltiples.

Técnicas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos aislados

Para la determinación de las mezclas se empleó un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas SHIMADZU QP2010 plus, ubicado en el laboratorio de química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. La separación se realizó en una columna capilar SHRXI-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm con una inyección en modo Split (10:0), el gas de arrastre utilizado fue

helio (grado 5,0) con flujo constante de 1,2 mL/min. La programación de la temperatura del horno fue de 50 °C (2 min), incremento de 15 °C/min, hasta 200 °C (2 min), incremento de 10 °C/min, hasta 300 °C (10 min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos, las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 °C y 275 °C, respectivamente.

Los espectros de masas de las sustancias aisladas fueron tomados en un equipo SHIMADZU MS QP2010 dotado con sonda de inserción directa y analizador de masas cuadrupolar. El modo de ionización fue ionización electrónica (IE) a 70eV y la temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C.

Los espectros de RMN ¹H fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance. Los análisis se realizaron a 300 MHz para RMN ¹H, empleando como solvente CDCl₃, con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

RESULTADOS

Análisis fitoquímico preliminar

Los resultados de los ensayos químicos preliminares realizados al extracto etanólico de hojas (E.EtOH.H) de la especie *Cavendishia compacta* se encuentran en la tabla 1.

Metabolitos secundarios aislados

Mezcla CcH₁

La mezcla CcH₁ se obtuvo como un sólido (9,2 mg) de color blanco. En el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de la mezcla CcH₁ se obtuvieron tres señales en la corriente iónica total (TIC). La comparación de los espectros de masas con los de la librería NIST 08 confirma la presencia Rimueno, Biformeno y Kaurano.

Mezcla CcH₂

La mezcla CcH₂ se obtuvo como un sólido (21,6 mg) de color verde. En el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de la mezcla CcH₂ se obtuvieron dos señales en la corriente iónica total (TIC). La comparación de los espectros de masas con los de la librería NIST 08 confirma la presencia de Acetofenona y Benzaldehído.

Tabla 1. Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas de la *Cavendishia compacta*.

Metabolitos secundarios		Análisis	Resultado en E.EtOH.H
Taninos	Taninos	Cloruro férrico	-
		Acetato de plomo	-
		Gelatina sal	-
Leucoantocianidinas	Leucoantocianidinas	Rosenhein	+
Flavonoides	Flavonoides	Shinoda	+
Quinonas	Naftoquinona y antraquinona	Borträger-Kraus	+
		Comportamiento ante ácidos y donador de protones	-
		Rodamina y amoniaco	-
		Hidrosulfito de sodio	-
Cumarinas	Cumarinas	Hidroxamato férrico	-
		Erlich	-
Terpenoides y esteroides	Sesquiterpenlactonas	Hidroxamato férrico	+
	Triterpenos	Lieberman-Buchard	+
		Dienos Homonucleares	+
	Saponinas	Espuma	-
		Rosenthal	-
	Glucósidos cardiotónicos	Baljet	-
		Tollens	-
		Antrona	-
		Molish	-
	Carotenoides	Salkowski	-
Alcaloides	Alcaloides	Valser	-
		Mayer	-
		Dragendorff	-
		Schleiber	-
		Wagner	-

+: resultado positivo. -: resultado negativo. E.EtOH.H: extracto etanólico hojas.

Mezcla CcH₃

La mezcla CcH₃ se obtuvo como un sólido (30 mg) de color blanco. En el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de la mezcla CcH₃ se obtuvieron dos señales en la corriente iónica total (TIC). La comparación de los espectros de masas con los de la librería NIST 08 confirma la presencia de α - amirina y β - amirina.

Compuesto CcH₄ T3

El compuesto CcH₄ se obtuvo como un sólido (87 mg) de color amarillo, el cual fue analizado a través de espectrometría de masas por inserción directa. En el espectro de masas se observa el ion molecular a m/z 302, el pico base m/z 285 (M-OH) y señales en m/z 153, 134, 121, 108 resultantes del mecanismo Retro Diel Alder (RDA) el cual corresponde al flavonol morina [6]. El espectro RMN ¹H del compuesto CcH₄ muestra dos singletes en δ 3,90 y 3,93 ppm correspondientes a grupos hidroxilos en la posición C-2' y C-4' del anillo B; dos dobletes en δ 5,93 ppm (2 Hz, 1H) y 6,43 ppm (2 Hz, 1H), que corresponden a protones acoplados en posición meta (C-6 y C-8) del anillo A; un doblete en δ 6,59 ppm (2 Hz, 1H) ubicado en C-3' y un doblete en 6,95 ppm (C-5') (8 Hz, 2 Hz, 1H) que corresponden a protones del anillo B y un último doblete en δ 7,53 ppm (C-6') (8 Hz, 1H), todos ellos característicos de hidrógenos aromáticos.

Luego del análisis de los datos de RMN ¹H, EM y de la comparación con datos reportados en la literatura (ver tabla 2), se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los hidrógenos de la molécula la cual se identificó como morina.

Compuesto CcH₅

El compuesto CcH₅ obtenido como un sólido de color verde (160 mg) fue analizado a través de espectrometría de masas por inserción directa. En el espectro de masas se muestra el ion molecular a m/z 318 y señales en m/z 317 (M-H), 302, el pico base en m/z 179 (M-138), 136 y 138 el cual corresponde al flavonol Miricetina [8]. El espectro de RMN ¹H del compuesto CcH₅, muestra tres singletes en δ 3,90; 3,11 y 3,93 ppm correspondientes a grupos hidroxilos ubicados en las posiciones C-3', C-4' y C-5' [9], dos dobletes en δ 5,36 ppm (2 Hz, 1H) y 5,38 ppm (2 Hz, 1H) correspondientes a protones unidos en las posiciones C-8 y C-6 respectivamente, finalmente un singlete en δ 6,93 ppm que corresponde a dos protones unidos al C-2' C-6' [10].

Luego del análisis de los datos de RMN ¹H, EM y de la comparación con datos reportados en la literatura (ver tabla 3), se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los hidrógenos de la molécula la cual se identificó como Miricetina.

Tabla 2. Comparación de los desplazamientos químicos RMN ^1H del compuesto CcH_4 con el de morina.

Posición	CcH_4^*	morina**
C1	-	-
C2	-	-
C3-OH	-	-
C4	-	-
C5-OH	-	-
C6-H	5,93 (d, J=2 Hz)	6,15 (d, J=2,0 Hz)
C7-OH	-	-
C8-H	6,43 (d, J=2 Hz)	6,27 (d, J=2,0 Hz)
C9	-	-
C10	-	-
C1'		
C2'-OH	3,93 (s)	-
C3'-H	6,59 (d, J=2 Hz)	6,41 (d, J=2,2 Hz)
C4'-OH	3,90 (s)	-
C5'-H	6,93 (dd, J=8 Hz; 2 Hz)	6,35 (dd, J=8,4; 2,2 Hz)
C6'-H	7,53 (d, J= 8Hz)	7,21 (d, J=8,4 Hz)

*Datos obtenidos a 300MHz para RMN ^1H (solvente: CDCl_3).

** Datos obtenidos a 200 MHz para RMN ^1H (solvente: CD_3OD) [7].

Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto CcH_5 con los de Miricetina.

Posición	CcH_5^*	Miricetina**
C1	-	-
C2	-	-
C3-OH	-	-
C4	-	-
C5-OH	-	-
C6- H	5,38 (d, J= 2 Hz)	6,35 (d, 2H)
C7-OH	-	-

(Continúa)

Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto CcH₅ con los de Miricetina (*continuación*).

Posición	CcH ₅ *	Miricetina**
C8-H	5,36 (d, J= 2 Hz)	6,18 (d, 2H)
C9	-	-
C10	-	-
C1'	-	-
C2'	-	-
C3'-OH	3,90 (s, 2H)	4,01 (s, 2H)
C4'-OH	3,11 (s)	3,96 (s)
C5'-OH	3,93 (s, 2H)	4,15 (s, 2H)
C6'-H	6,93 (s, 2H)	6,94 (s, 2H)

* Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H (Solvente: CD₃OD).** Datos obtenidos a 200 MHz para RMN ¹H (Solvente: CD₃OD) [9, 10].

Actividad antiinflamatoria

El extracto etanólico (E.EtOH.H) y las fracciones de Hexano (F.HEX.CcH), diclorometano (F.CH₂Cl₂.CcH) y acetato de etilo (F.AcOEt.CcH) fueron evaluadas mediante el ensayo *in vivo* de edema inducido en oreja de ratón por TPA. Los metabolitos aislados no fueron evaluados en este modelo por la cantidad de sustancia requerida para el análisis. Los datos analizados estadísticamente fueron los deltas de peso, ya que estos son los que determinan el edema o la inflamación, de esta manera, se efectuó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA).

Se realizaron dos pruebas para comprobar la distribución normal y la homogeneidad de varianzas de la población. La distribución normal se evaluó mediante una prueba de Ryan-Joiner con un nivel de confianza del 95%, esto implicó contrastar siguientes hipótesis: **H₀**: la población sigue una distribución normal, **H₁**: la población no sigue una distribución normal.

Posteriormente, la prueba de Ryan-Joiner indicó que la población de datos seguía una distribución normal ya que el p-valor= >0,1 fue mayor que el α =0,05, por lo tanto, hay argumentos suficientes para aceptar la hipótesis nula (ver figura 1).

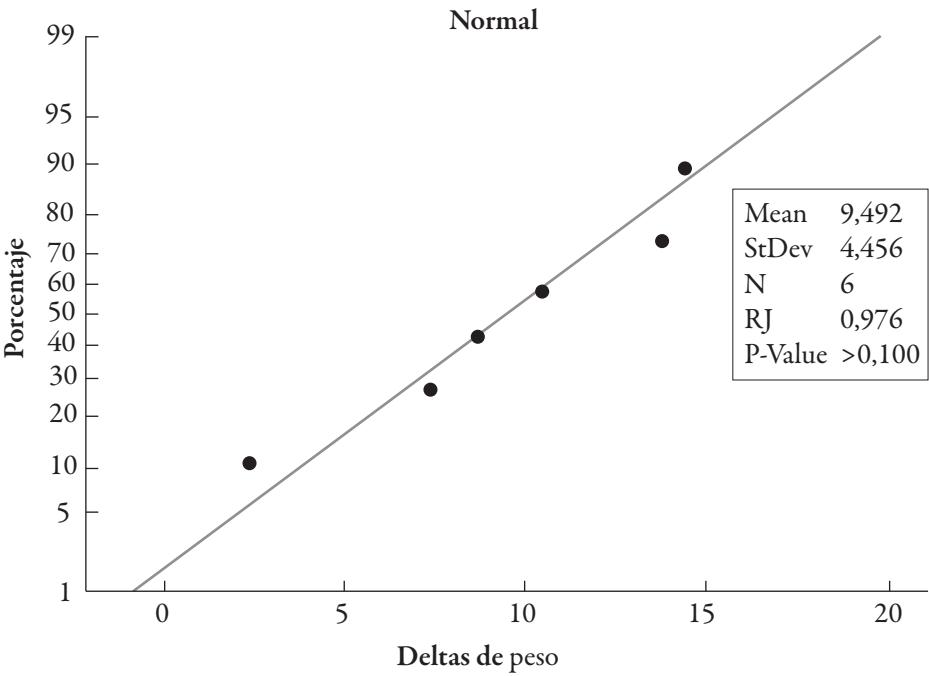


Figura 1. Gráfica de normalidad para la población de datos.

La homogeneidad de varianzas se evaluó mediante una prueba de Levene con un nivel de confianza del 95%, la cual pone en contraste las dos siguientes hipótesis: H_0 : en la población no hay homogeneidad de varianzas, H_1 : en la población hay homogeneidad de varianzas.

Así, la prueba de Levene indicó que hay homogeneidad de varianzas en la población ya que el p-valor=0.0 fue menor que el $\alpha=0,05$, por lo que, no hay argumentos suficientes para aceptar la hipótesis nula (ver figura 2).

Method	Test		Statistic	P-Value
	DF1	DF2		
F Test (normal)	35	35	8,15	0,000
Levene's Test (any continuous)	1	70	25,91	0,000

Figura 2. Prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas.

Después de comprobar los parámetros requeridos para el análisis de varianza, se procedió a calcular el estadístico ANOVA para un solo factor con un nivel de confianza del

95%, el cual pone a prueba las dos siguientes hipótesis: H_0 : al menos uno de los tratamientos es diferente, H_1 : no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

El ANOVA para un solo factor fue calculado con el *software Minitab 16.2.3* y el resultado obtenido fue que si existen diferencias significativas entre los tratamientos, ya que el p-valor=0,315 fue mayor que el $\alpha=0,05$, por lo cual, hay argumentos suficientes para aceptar la hipótesis nula (ver figura 3).

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	5	16,46	3,29	1,24	0,315
Error	30	79,64	2,65		
Total	35	96,10			

$$S = 1,629 \quad R-Sq = 17,13\% \quad R-Sq(adj) = 3,32\%$$

Figura 3. Análisis de varianza de un solo factor para los tratamientos.

Como el análisis de varianza se evidenció que hay diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba de comparación múltiple para averiguar cuáles eran los tratamientos más significativos. La prueba de comparación múltiple que se escogió para analizar los datos fue la prueba de Dunnett, ya que esta prueba compara las medias de cada uno de los tratamientos contra el control, lo cual permite observar que tan buena fue la respuesta de cada uno de ellos con respecto a la respuesta del control. La prueba de Dunnett se calculó con el *software Minitab 16.2.3* con un nivel de confianza del 95%. Este estadístico pone a prueba las siguientes hipótesis: H_0 : la media del tratamiento x es igual a la media del control, H_1 : la media del tratamiento x es diferente a la media del control.

Esta prueba indicó que los tratamientos más significativos obtenidos de las hojas de *Cavendishia compacta* fueron el extracto E.EtOH.H con un p-valor=0,00 y la fracción F.CH₂Cl₂-CcH con un p-valor= 0,00. Al ser estos dos valores menores que el $\alpha=0,05$ no hay argumentos suficientes para aceptar la hipótesis nula (ver figura 4).

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	5	599,41	119,88	14,00	0,000
Error	30	256,83	8,56		
Total	35	856,24			

$$S = 2,926 \quad R-Sq = 70,00\% \quad R-Sq(adj) = 65,01\%$$

Figura 4. Prueba de Dunnett para comparación múltiple.

Los tratamientos 2 (indometacina), 3 (E.EtOH.H) y 5 (F.CH₂Cl₂.CcH) que no están etiquetados con la letra A son significativamente diferentes a la media del control (ver figura 5).

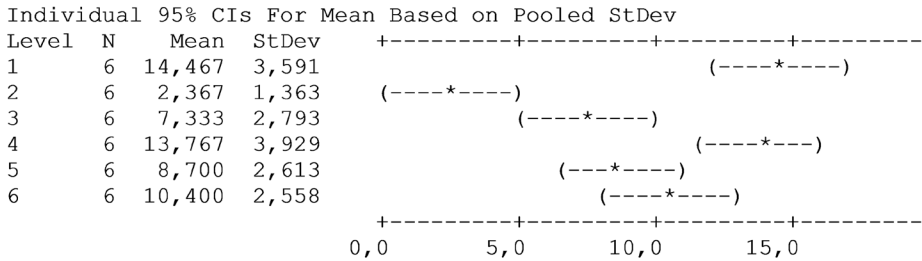
Grouping Information Using Dunnett Method

Level	N	Mean	Grouping
1 (control)	6	14,467	A
4	6	13,767	A
6	6	10,400	A
5	6	8,700	
3	6	7,333	
2	6	2,367	

Means not labeled with letter A are significantly different from control level mean.

Figura 5. Método de Dunnett.

En la figura 6 están los intervalos de confianza a un nivel del 95% para la media, al menos, las medias procedentes de los tratamientos 2 (1,366); 3 (2,793) y 5 (2,613) son significativamente diferentes a las del control:



Pooled StDev = 2,926

Figura 6. Gráfico de medias por la prueba de Dunnett.

De otro lado, la tabla 4 muestra los resultados del efecto del extracto y las fracciones evaluadas sobre el edema producido por la aplicación del TPA, encontrándose, que el extracto E.EtOH.H y la fracción F.CH₂Cl₂.CcH exhibieron una actividad antiinflamatoria moderada respecto al control con un porcentaje de inhibición del edema de 49,3% y 39,8%, respectivamente, mientras que la indometacina mostró una inhibición del edema de 83,6% a la misma dosis, con lo que se confirma la validez del ensayo y los resultados mostrados por el extracto y las fracciones evaluadas. Las fracciones F.HEX. CcH y F.AcOEt.CcH presentan un efecto antiinflamatorio nulo ya que sus porcentajes de inhibición fueron del 4,8% y 28,1% respectivamente.

Tabla 4. Efectos del extracto y las fracciones evaluadas de *Cavendishia compacta* sobre el edema auricular inducido por TPA.

Tratamiento	(Δ) Edema (mg) ± EEM	% Inhibición
Control	14,4 ± 3,59	-
Indometacina	2,36 ± 1,36	83,6
E.EtOH.H	7,33 ± 2,79	49,3
F.HEX.CcH	13,76 ± 3,29	4,8
F.CH ₂ Cl ₂ .CcH	8,7 ± 2,61	39,8
F.AcOEt.CcH	10,4 ± 2,55	28,1

* Datos expresados como la media ± error estándar de la media (E.E.M); n=6.

Los valores obtenidos para los tratamientos, el control y la indometacina se analizaron de forma gráfica (ver figura 7), lo cual corrobora los resultados del análisis estadístico, ya que los tratamientos que presentaron una acción antiinflamatoria moderada fueron aquellos que tuvieron un porcentaje de inhibición de la inflamación entre 35-65%.

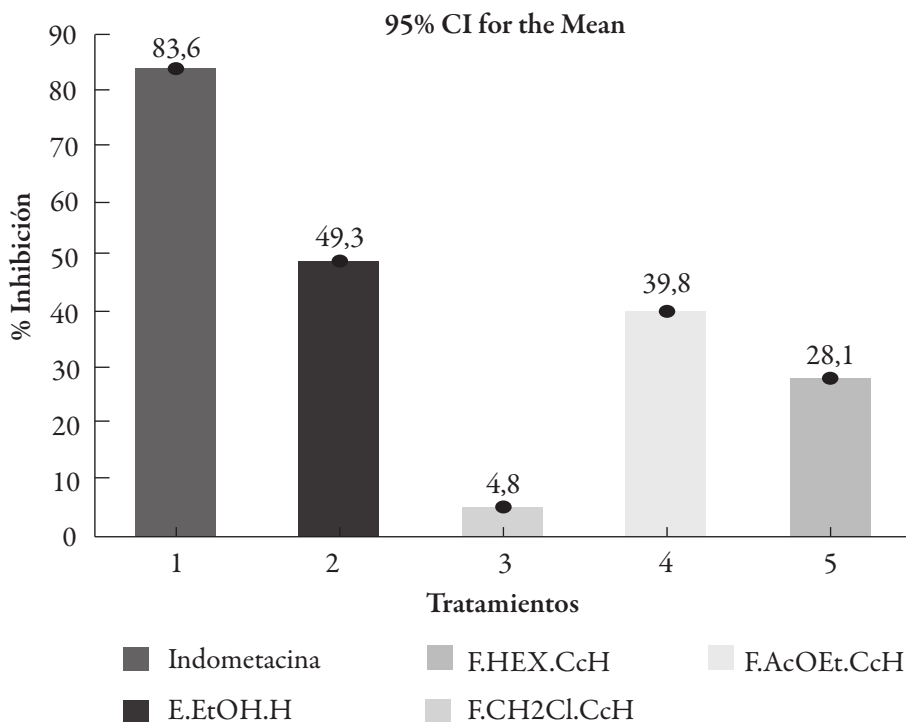


Figura 7. Promedios de porcentajes de inhibición de inflamación para los tratamientos y la indometacina.

DISCUSIÓN

El estudio fitoquímico preliminar indica la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y terpenoides en la planta lo cual confirma lo encontrado por varios autores que destacan la presencia de estos compuestos en especies de la familia Ericaceae [8, 11, 12].

Este es el primer estudio fitoquímico realizado a la especie vegetal *Cavendishia compacta*. Como resultado del mismo se aislaron e identificaron tres mezclas conformadas por diterpenos, aldehídos aromáticos y triterpenos, así como dos sustancias que corresponden a flavonoides. De acuerdo con los antecedentes descritos en la bibliografía, los constituyentes químicos mayoritarios presentes en la familia Ericaceae y particularmente en el género *Cavendishia* son los flavonoides y terpenos, y los resultados del presente estudio demuestran que *Cavendishia compacta* no es la excepción, ya que la gran mayoría de los compuestos aislados pertenecen a esta categoría de metabolitos secundarios.

Los diterpenos identificados en la mezcla CcH₁ han sido aislados de otras familias de especies vegetales; para el caso del Rimueno ha sido reportado en: *Cupressinum dacrydium* (Podocarpaceae), *Thujopsis dolabrata*, *Thuja standishii* (Cupressaceae), *Illicium griffithii* (Illiciaceae) [13]; El Biformeno ha sido aislado previamente de la especie *Helianthus Decapetalus* (Asteraceae) [14] y también ha sido encontrado en especies como *Pinus contorta* perteneciente a la familia Pinaceae [15]; el Kaurano ha sido ampliamente estudiado en varias familias como las Asteraceae principalmente especies del género *Pentacalia* tales como *Pentacalia corymbosa*, *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia pulchella*, [16]. En la familia Ericaceae no se han reportado estudios acerca de la presencia de Rimueno, Biformeno y Kaurano siendo este el primer reporte para el género *Cavendishia* y para la especie *Cavendishia compacta*.

Los compuestos identificados como aldehídos aromáticos en la mezcla CcH₂ no se han reportado para la familia Ericaceae, el estudio indica la presencia de benzaldehído y acetofenona, siendo este es el primer reporte para el género *Cavendishia* y para la especie *Cavendishia compacta*.

Los compuestos identificados como triterpenos para la mezcla CcH₃ han sido identificados en familias como la Asclepiadaceae específicamente en la especie *Hemidesmus indicus* [17] y en la familia Burseraceae en las especies *Protium kleinii* y *Protium heptaphyllum* [18]. Para la familia Ericaceae se han encontrado estudios en especies como *Craibiodendron yunnanense* [19]; el género *Rhododendron* también reporta la presencia de esta mezcla de triterpenos en la especie *Rhododendron dauricum* [20],

Rhododendron canescens [21], *Rhododendron Tormetosum* [11] y en la especie *Vaccinium macrocarpon* [22] y las especies *Bejaria congesta*, *Bejaria aestuans* y *Bejaria resinosa* [23]. En el género *Cavendishia* no se han reportado estudios acerca de la presencia de α -amirina y β -amirina siendo este el primer reporte para la especie *Cavendishia compacta*.

El compuesto $C_{15}H_{10}O_4$ identificado como morina se ha reportado como un flavonoide de pigmento amarillo en la familia *Moraceae* [24, 25] y se ha identificado en frutas, verduras, té, vino y en muchas plantas medicinales orientales, entre ellas se encuentra en las hojas de guayaba, cebolla y manzana [25]. En la familia *Ericaceae* no se han reportado estudios acerca de la presencia de morina, este es el primer reporte para el género *Cavendishia* y para la especie *Cavendishia compacta*.

El compuesto $C_{15}H_{10}O_5$ identificado como miricetina según B. Sultana y Anwar en 2008 [26] se ha reportado en órganos de plantas medicinales como en la corteza de *Acacia nilotica* (Fabaceae), en hojas de *Moringa oleifera* (Moringaceae) y *aloe vera* (Xanthorrhoeaceae), en raíces de *Moringa oleifera* (Moringaceae) y en el fruto del *Ficus religiosa* (Moraceae), así como en muestras de Laurel o *Laurus nobilis* (Lauraceae), hierba de san Juan o *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) y té verde, y en el extracto de la *Eugenia* (Mirtaceae).

En la familia *Ericaceae* se ha reportado la presencia de miricetina en el género *Rhododendron* en las especies *Rhododendron dauricum* [20], *Rhododendron tormetosum* [11], *Rhododendron mucrunulatum* [10] y *Rhododendron naamkwanense* [27]. En el género *Cavendishia* no se han reportado estudios acerca de la presencia de miricetina siendo este el primer reporte para la especie *Cavendishia compacta*.

En la familia *Ericaceae* se han reportado estudios relacionados con la actividad antiinflamatoria en varias especies como *Arctostaphylos uva-ursi* la cual presenta actividad inflamatoria en el extracto etanólico de sus hojas [28], la especie *Bejaria resinosa* cuyos extractos de hojas, flores y frutos presentan actividad antiinflamatoria moderada [23]. La especie *Calluna vulgaris* en los extractos de n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, n-butanol y residuo hidroalcohólico [29]. El extracto metanólico de las hojas y ramas de la especie *Ledum groenlandicum* han sido empleados para tratar diversas patologías inflamatorias como el asma, reumatismo y quemaduras obteniendo un alto porcentaje de inhibición [30] y en el género *Rhododendron* como el extracto de hojas y flores de *Rhododendron brachycarpum* y la fracción de acetato de etilo de *Rhododendron ponticum* las cuales presentan alta respuesta antiinflamatoria [31].

CONCLUSIONES

El trabajo fitoquímico desarrollado en hojas de *Cavendishia compacta* permitió el aislamiento e identificación de una mezcla de diterpenos (rimueno, biformeno y kaurano); una mezcla de triterpenos (α y β amirina); una mezcla de compuestos aromáticos (benzaldehído y acetofenona) y dos compuestos de tipo flavonoide, morina y miriceína, los cuales se reportan por primera vez para la especie.

La determinación de la actividad antiinflamatoria en el modelo in vivo permitió establecer que el extracto E.EtOH.H y la fracción F.CH₂Cl₂.CcH exhibieron una actividad antiinflamatoria moderada con porcentajes de inhibición de 49,3% y 39,8% respectivamente, pues redujeron significativamente el edema causado por el TPA en la oreja del ratón con porcentajes de inhibición menores a los presentados por el fármaco de referencia, indometacina.

El presente estudio es un aporte a las investigaciones fitoquímicas de la familia *Ericaceae* en Colombia y en particular del género *Cavendishia*, ya que este es el primer reporte reciente en cuanto a la constitución de metabolitos fijos de un género que cuenta con escasos estudios químicos y biológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Productos Naturales Vegetales adscrito al Proyecto Curricular de Licenciatura en Química, Facultad de Ciencias y Educación, Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. J. L. Luteyn, Ericaceae, en: N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D. W. Stevenson y S. V. Heald, "Flowering plants of the neotropics. The New York Botanical Garden", Nueva York, 2004, pp. 140-143.
2. Amado Ariza, S., & A. Chocontá López (2016). Análisis fitoquímico de cinco especies nativas de las zonas rurales de Bogotá D.C. (Colombia). *Boletín Semillas Ambientales*, **10**(1). Recuperado de <https://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/bsa/article/view/10766>

3. K. Dastmalchi, G. Flores, V. Petrova, P. Pedraza-Peñalosa, y E.J. Kennelly, Arándanos neotropicales comestibles: análisis antioxidante y compositivo de huellas dactilares. *Diario de Química Agrícola y Alimentaria*, **59** (7), 3020- 3026 (2011). DOI: 10.1021 / jf200367j
4. A. Sanabria, “Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*”. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
5. M. Garcia, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae), *J Ethnopharmacol*, **91**(1),69-73 (2004). DOI: 10.1016/j.jep.2003.11.018
6. H. McNab, E.S.B. Ferreira, A.N. Hulme & A. Quye, Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids. An isotopic labelling study, *International Journal of Mass Spectrometry*, **284**(1-3), 57-65 (2009).
7. R.L. Pelachim e R.N. Castro, Melisolamento e Identificação do Flavonol morina em Mel de *Apis mellifera*. *Quím. Nova*, **31**(1c), 0-1 (2008).
8. A. Lhuillier, N. Fabre, F. Moyano, N. Martins, C. Claparols, I. Fourasté, & C. Moulis, Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, **1160**(1-2), 13-20 (2007).
9. A.R. Bilia, J. Mendez, & I. Morelli, Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*, *Pharmaceutica Acta Helveticae* **71**, 191-197 (1996).
10. S.Y. Mok, & S. Lee, Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for albiflorum and their inhibitory activities against aldose reductase, *Food Chemistry*, **136**(2), 969-974 (2013).
11. A. Dampc, & M. Luczkiewicz, *Rhododendron tomentosum* (Ledum palustre). A review of traditional use based on current research, *Fitoterapia*, **85**, 130-143 (2013).
12. A. Andrade- Cetto, & M. Heinrich, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, **99**(3), 325-348. (2005).
13. A. Vijayakumar, V. Duraipandiyan, B. Jeyaraj, P. Agastian, M.K. Raj, & S. Ignaci-muthu, Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of *Illicium griffithii* Hook. f. & Thoms extracts, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2** (3), 190-199 (2012).

14. C. Nakano, T. Hoshino, T. Sato, T. Toyomasu, T. Daiiri, & T. Sassa, Substrate specificity of the CYC2 enzyme from *Kitasatospora griseola*: production of sclarene, biformene, and novel bicyclic diterpenes by the enzymatic reactions of labdane- and halimane-type diterpene diphosphates, *Tetrahedron Letters*, **51** (1), 125-128 (2010).
15. I. Backlund *et al.*, Extractive profiles of different lodgepole pine (*Pinus contorta*) fractions grown under a direct seeding-based silvicultural regime, *Industrial Crops and Products*, **58**, 220-229 (2014).
16. I. F. Santana, “Estudio químico de la especie colombiana *Pentacalia abietina* (Willd. ex. Wedd) Cuatr. como nueva fuente natural de compuestos tipo kaurano y quinol”, Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, 2010.
17. S.A. Nair, B. Sabulal, J. Radhika, R. Arunkumar, & A. Subramoniam, Promising anti-diabetes mellitus activity in rats of β -amyirin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots, *European Journal of Pharmacology*, **734**(1), 77-82 (2014).
18. K.A. da Silva, A.F. Paszcuk, G.F. Passos, E.S. Silva, A.F. Bento, F.C. Meotti, J. B. Calixto, Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyirin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice, *Pain*, **152** (8), 1872-1887 (2011).
19. C. Zhou, X. Li, H. Li & R. Li, Chemical constituents from the leaves of *Craibiodendron yunnanense*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **45**, 179-182 (2012).
20. Y. Cao, Q. Chu, & J. Ye, Chromatographic and electrophoretic methods for pharmaceutically active compounds in *Rhododendron dauricum*, *Journal of Chromatography* (2004).
21. J.A. Balsdon, K.E. Espelie, & S.K. Braman, Epicuticular lipids from azalea (*Rhododendron* spp.) and their potential role in host plant acceptance by azalea lace bug, *Stephanitis pyrioides* (Heteroptera: Tingidae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**(5), 477-485 (1995).
22. D. Cunningham, *et al.* Constituyentes fitoquímicos del arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*) y sus beneficios para la salud, *Revista de Fitoterapia*, **5**(1) (2005).
23. J.A. Matulevich & E. Gil, Composición química del aceite esencial de hojas de bejaría resinosa (*Ericaceae*). Revista Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada, **10**(2), 125-132 (2014).

24. L.G. Naso, L. Lezama, T. Rojo, S.B. Etcheverry, M. Valcarcel, M. Roura, P. Williams, Biological evaluation of morin and its new oxovanadium (IV) complex as antioxidant and specific anti-cancer agents, *Chem Biol Interact*, **206**(2): 289-301(2013). DOI: 10.1016 / j.cbi.2013.10.006
25. B. Sultana & F. Anwar, Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants, *Food Chemistry*, **108**(3), 879-884 (2008).
26. R.P. Doss, Essential Oils and Rhododendron Scales, *American Rhododendron Society*, **42**(1987).
27. D.M. Vucic, M.R. Petkovic, B.B. Rodic-Grabovac, S.M. Vasic, L. Comic, In vitro efficacy of extracts of *Arctostaphylos uva-ursi* on clinical isolated *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* strains, *Kragujevac Journal of Science*, **35**, 107-113 (2013).
28. I.Orhan, E. Küpeli, S. Terzioğlu, & E. Yesilada, Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L., *Journal of Ethnopharmacology*, **114**(1), 32-37 (2007).
29. D. Dufour, A. Pichette, V. Mshvildadze, M.E. Bradette-Hébert, S. Lavoie, A. Longtin, J. Legault, Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius, *Journal of Ethnopharmacology*, **111**(1), 22-28 (2007).
30. A. Ghimeray, *et al.*, Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory effect of rhododendron brachycarpum extract used in skin care product by in vitro and in vivo test, *Technology and Investment*, **6**, 105-111 (2015). DOI: 10.4236/ti.2015.62011
31. N. Erdemoglu, E.K. Akkol, E. Yesilada, & I. Caliş, Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, **119**(1), 172-178 (2008).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

S.P. Vasco-Zamudio, W.F. Castrillón-Cardona, J.A. Matulevich-Peláez, L.X. Díaz-Barrera, Estudio fitoquímico de hojas de *Cavendishia compacta* (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 61-79 (2019).

Essential oils as a source of bioactive molecules

Glicerio León-Méndez^{1,2*}, Nerlis Pájaro-Castro³, Enilson Pájaro-Castro³, Miladys Torrenegra-Alarcón¹, Adriana Herrera-Barros⁴

¹Faculty of Health Science Corporación Universitaria Rafael Nuñez. Programa de Tecnología de Estética y Cosmetología (GITEC). Cartagena, Bolívar, Colombia.

*Email: gleonm1@unicartagena.edu.co

²Doctorate student in Engineering University of Cartagena. Cartagena, Bolívar, Colombia.

³Department of Medicine, School of Health Sciences, Medical and Pharmaceutical Sciences Group, University of Sucre, Sincelejo, Sucre 700003.

⁴Faculty of Engineering, University of Cartagena, Research in Multi-functional Nanomaterials Group, Cartagena, Bolívar 130015.

Received: May 31, 2018

Accepted: November 26, 2018

SUMMARY

Nature gives us a large number of compounds with interesting biological properties, within them we have essential oils, which are an important source of new bioactive molecules, which can replace synthetic chemicals, since they are friendly to the environment and they are less toxic. Currently there are more than 20.000 publications in which essential oils are related to some biological activity, according to the search made in different databases until January 2018. This confirms the wide utility of essential oils as the main source of bioactive metabolites, which can be used in different areas of our life.

Keywords: Natural products, plants, terpenes, volatile compounds, biological activity, phenylpropanes.

RESUMEN

Aceites esenciales como fuentes de moléculas bioactivas

La naturaleza nos proporciona una gran cantidad de compuestos con interesantes propiedades biológicas, dentro de los cuales tenemos los aceites esenciales, los cuales son una fuente importante de nuevas moléculas bioactivas, que pueden reemplazar a los químicos sintéticos, ya que son amigables con el medio ambiente y son menos tóxicos. Actualmente existen más de 20.000 publicaciones en las que los aceites esenciales están relacionados con alguna actividad biológica, según la búsqueda realizada en diferentes bases de datos hasta enero de 2018. Esto confirma la amplia utilidad de los aceites esenciales como principal fuente de metabolitos bioactivos, que pueden ser utilizados en diferentes áreas de nuestra vida.

Palabras clave: Productos naturales, plantas, terpenos, compuestos volátiles, actividad biológica, fenipronanos.

INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile organic compounds produced in the form of secondary metabolites in plants that can contain about 20-60 components in very different concentrations [1, 2]. They are characterized because they contain two or three main components in relatively high concentrations (20-70%) compared to other components present in minimal amounts [3]. They may consist of monoterpenes, sesquiterpenes, and phenylpropanes, which may contain different functional groups (alkanes, alcohols, aldehydes, ketones, esters and acids) [1, 2].

In nature, EOs plays an important role in the protection of plants such as antibacterial, antiviral, antifungal, insecticide and also against herbivores, reducing their appetite for these plants. They are also responsible for the characteristic smell of plants, which can attract some insects to favor the dispersal of pollen and seeds, or repel other undesirable ones [3]. Around 3000 of the essential oils are known and 10% of them having commercial importance in the cosmetic, food and pharmaceutical industries, and in agriculture [3, 4]. Therefore, they are generally recognized as safe by the FDA (Food and Drug Administration). Its composition can vary considerably between species of aromatic plants and varieties and within the same variety of different geographical areas [1].

METHODOLOGY

An exhaustive search was carried out in PubMed, Scopus, Google scholar and SciELO databases to find an article that related the different biological activities of essential oils and their components. The search was conducted until January 2018. A text-mining step was carried out in order to detect citation-associated relationships between essential oils and several biological activities. Taking into account the dates of publication and the country of origin.

These keywords were recognized through literature reviews using a wide variety of academic databases and search engines available online, such as GoPubMed (<http://gopubmed.org/web/gopubmed/>), pubGraph (<http://datamining.cs.ucla.edu/cgi-bin/pubgraph.cgi>), and Helioblast (<http://helioblast.heliotext.com/>) and the analysis of associations among these terms was done in the PubMed/Medline literature database was carried out using the Jaccard co-occurrence score, as a measure of the degree to which the two queries coincide among all publications. The information obtained was organized in order to identify the reported biological activity, the essential oil responsible for the activity and the biologically active concentration.

RESULTS

Bioactivity of essential oils

The EOs has a wide application in pharmacology (see figure 1), especially for their antimicrobial properties [5, 6], the hydrocarbon and oxygenated monoterpenes are able to destroy the cellular integrity and therefore inhibit respiration and transport of ions [7]. The terpenes; Pine, myrcene, limonene, Ocimene, linalool, and verbenum are related to the antimicrobial activity of the essential oil of *Bidens pilosa* [7]. Essential oils with an abundance of phenylpropanoids and phenols inhibit platelet aggregation. The α -terpineol has cytotoxic properties, D-limonene, anticancer in male rats [1], perillilic alcohol used in the treatment of different types of cancer, which is found in Phase I and II clinical studies [8], antiseptic, anti-inflammatory, antioxidant, antifungal, antidepressant, aphrodisiac and other properties present in a greater or lesser degree in all oils [1, 3, 9, 10]. They are also used for their relaxing or stimulating effects on the Central Nervous System, bronchial, urinary infections and those caused by cuts and burns [3, 11].

Many studies carried out with essential oils have reported that they have a broad microbiological activity such as: antifungal [12], antibacterial [13-15], acaricide [16],

insecticide [17,18], antimalarial [19], quorum sensing [20], and antiviral [21]. They also have properties such as: analgesics [7], antipyretics [22], anti-inflammatories [7, 23], anticonvulsants [24], as an estrogenic agent [25], hepatoprotective [26], anticancer [27] and antimutagenic [28]. They are also used in the treatment of gastric ulcer and different types of cancer [3].

The EOs has shown antiviral activity against species of the Flavivirus genus. In fact, it has been shown that the EOs of *Lippia origanoides*, *Oreganum vulgare*, *Lippia alba* and *Artemisia vulgaris* have an antiviral effect against the yellow fever virus [29]. Nowadays, there are reports of the antiviral activity of essential oils against the dengue virus. Authors such as Pájaro-Castro *et al.* [30], Ocazonez *et al.* [31], Meneses *et al.* [32], Meneses *et al.* [33], Duschatzky *et al.* [34] and García *et al.* [35] has revealed the antiviral properties of these natural products. In the field of agriculture, EOs have been recognized for their repellent activity [36, 37], insecticide and fumigant [38-40]. Neuro *et al.*, [1] reported more than 80 different essential oils families with repellent activity for arthropod species.

Table 1. Biological activities reported for essential oils.

Bioactivity reported	Reference
Antibacterials	[13-15]
Antivirals	[30-35]
Antifungals	[12]
Antimalarial	[19]
Insecticides	[17-18]
Insect repellents	[36-37]
Antidepressant	[1,3]
Anticancer	[27]
Antimutagenic	[28]
Hepatoprotective	[26]
Antiinflammatory	[7, 23]
Antioxidant	[1, 3]
Analgesics and antipyretics	[7, 22]
Anticonvulsants	[24]

Taking into account that essential oils are complex mixtures of many molecules, it is important to establish if the biological activities identified in them are due to a single component or several of them, that is, if their biological effects are the result of a

synergy of all the molecules or if they reflect only the main molecules present at the highest levels according to the gas chromatography analysis [1, 2]. The studies found in the literature generally do not answer this question. In general, it is found that the main components reflect fairly well the biological characteristics of the essential oils from which they were isolated, and their effects depend only on their concentration when each component is analyzed independently or in some cases of the mixture. Therefore, it is possible that the activity of the main components is modulated by other molecules that are in lower concentration in the essential oil. In that sense, for biological purposes, it is more informative to study a complete essential oil instead of some of its components because the concept of synergy seems to be more significant [3].

In the search carried out using the keyword essential oils, 73814 articles were observed until 2018. An increase in the number of public articles was observed, being 929 in the year 1994, this value has been increased every year until 5853 in the year 2017 and 1524 until January 2018. The journals that have most published articles related to essential oils are: *Food Chemistry* (1746), *Journal of Chromatography A*. (1350), *Industrial Crops and Products* (1307) and *Phytochemistry* (1159).

When the search was carried out using the keywords essential oils and biological activity, 27.021 articles published up to 2018 were found, as well as an increase in the number of publications each year, being 319 for the year 1994 and 2656 for the year 2017, being 713 publications so far in 2018. Table 1 shows some of the essential oils with their concentrations reported with some biological activity worldwide. Taking into account the Jaccard co-occurrence c (-1.0), there is a clear association between the essential oils and the different biological activities reported. The main journals that have published an article with these two key words were: *Food Chemistry* (643), *Industrial Crops and Products* (625), *Journal of Ethnopharmacology* (549), *Journal of Chromatography A* (434), *Food and Chemical Toxicology* (375) and *Phytochemistry* (326).

General considerations

According to the bibliographic search carried out, essential oils are an important and rich source of bioactive molecules, which can be used in different fields of pharmaceutical sciences. In fact, many of these studies are focused on evaluating the phytochemical profile of a particular essential oil. The main biological activity attributable to essential oils is the antioxidant activity with 17846 reports (24.2%) until January 2018. In these studies, this activity has been reported in more than 100 essential oils from different plant species.

Table 2. Essential oils with their concentrations reported with some biological activity.

Biological activity	Eos	Concentration	Country	Publication date	Reference
Antioxidant	<i>Bidens pilosa</i> Linn	49.7 µg/mL	Japan	2008	[7]
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	23.97 µg/mL	Colombia	2015	[10]
	<i>Citrus sinensis</i>	6-23%	Mexico	2017	[28]
	<i>Citrus latifolia</i>	22-71%	Mexico	2017	[28]
Antiseptic action	<i>Eugenia caryophyllata</i>	2%	Colombia	2017	[9]
	<i>Cinnamomum verum</i>	2%	Colombia	2017	[9]
Antibacterial activity	<i>Citrus sinensis</i>	600 mg/mL	Colombia	2017	[13]
	<i>C. aurantifolia</i>	600 mg/mL	Colombia	2017	[13]
	<i>C. reticulata</i>	600 mg/mL	Colombia	2017	[13]
	<i>C. paradisi</i>	600 mg/mL	Colombia	2017	[13]
	<i>Minthostachys mollis</i>	500 mg/mL	Colombia	2016	[14]
	<i>Thymus vulgaris</i>	300-800 ppm	Colombia	2015	[15]
	<i>Cinnamomum verum</i>	300-800 ppm	Colombia	2015	[15]
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	300-800 ppm	Colombia	2015	[15]
Antiquorum sensing activity	<i>Piper bredemeyeri</i>	45.6 µg/mL	Colombia	2011	[20]
	<i>Piper brachypodom</i>	93.1 µg/mL	Colombia	2011	[20]
	<i>Piper bogotense</i>	513.8 µg/mL	Colombia	2011	[20]
Acaricidal activity	<i>Syzygium aromaticum</i>	2.5 mg/mL	Brazil	2018	[16]
Fumigant toxicity	<i>Curcuma longa</i>	11.36 mg/liter air	India	2002	[17]
Insecticidal activity	<i>Coriandrum sativum</i>	5.25 µL/L air	Colombia	2015	[30]
	<i>Cymbopogon martinii</i>	37.2 µL/L air	Colombia	2015	[40]
	<i>Cymbopogon nardus</i>	0.03-0.04 µL/cm ²	Colombia	2015	[40]
Hepatoprotective	<i>Mentha piperita</i> L	15 mg/kg	Africa	2018	[26]
Antitrypanosomal activity	<i>C. citratus</i>	1.83 µg/mL	Benin	2014	[19]
	<i>C. giganteus</i>	0.25 µg/mL	Benin	2014	[19]
	<i>C. nardus</i>	5.71 µg/mL	Benin	2014	[19]
	<i>C. schoenanthus</i>	2.1 µg/mL	Benin	2014	[19]

(Continúa)

Table 2. Essential oils with their concentrations reported with some biological activity (*continuación*).

Biological activity	Eos	Concentration	Country	Publication date	Reference
Anti-nociceptive activity	<i>Globba sessiliflora</i>	100 mg/kg	India	2017	[22]
Anti-inflammatory activity	<i>Globba sessiliflora</i>	100 mg/kg	India	2017	[22]
Antipyretic activity	<i>Globba sessiliflora</i>	100 mg/kg	India	2017	[22]
Anticonvulsant activity	<i>Laurus nobilis</i>	1 mL/kg	Iran	2002	[24]
Estrogenic activity	<i>Pimpinella. isaurica</i>	45 - 650 mcg/mL	Turkey	2004	[25]
	<i>P. peucedanifolia</i>	45 - 650 mcg/mL	Turkey	2004	[25]
Anticancer activity	<i>Elsholtzia ciliata</i>	0.017–0.021%	Lithuanian	2017	[27]
Antimutagenic activity	<i>Citrus sinensis</i>	5 µg/pl	Mexico	2017	[28]
	<i>Citrus latifolia</i>	5 µg/pl	Mexico	2017	[28]
Antiviral effect	<i>Lippia organoides</i>	1.1 mcg/mL	Colombia	2009	[29]
	<i>Lippia alba</i>	100 mcg/mL	Colombia	2009	[29]
	<i>Oreganum vulgare</i>	100 mcg/mL	Colombia	2009	[29]
	<i>Artemisia vulgaris</i>	100 mcg/mL	Colombia	2009	[29]
	<i>L. citriodora</i>	1.9-33.7 mcg/mL	Colombia	2009	[31]
	<i>Heterothalamus alienus</i>	44.2 ppm	Argentina	2010	[34]
	<i>Buddleja cordobensis</i>	39.0 ppm	Argentina	2010	[34]
	<i>Lippia junelliana</i>	14-20 ppm	Argentina	2003	[35]
	<i>Lippia turbinata</i>	14-20 ppm	Argentina	2003	[35]
Repellent activity	<i>Ocimum campechianum</i>	0.00006 µL/cm ²	Colombia	2014	[37]
	<i>P. pseudolanceifolium</i>	0.0001 µL/cm ²	Colombia	2014	[37]
	<i>Cananga odorata</i>	0.2 µL/cm ²	Colombia	2011	[41]
	<i>Lippia alba</i>	0.0002 µL/cm	Colombia	2011	[41]

Table 2. Essential oils with their concentrations reported with some biological activity (*continuación*).

Biological activity	Eos	Concentration	Country	Publication date	Reference
	<i>Tagetes minuta</i>	0.0021 mg	Kenya	2014	[42]
	<i>Tithonia diversifolia</i>	0.263 mg	Kenya	2014	[42]
	<i>Lippia pedunculosa</i>	60 ppm	Brazil	2017	[43]

The second biological activity that has been most reported for essential oils is the anti-microbial activity with 8815 (11.9%), followed by insecticidal and repellent activity with 7827 (10.6%), and the least reported activities are anticancer, estrogen, hepatoprotective, anticonvulsant, antimutagenic, antiviral, antipyretic, acaricide, antinoceptive, antitripanosomal, anti-inflammatory activity, from major to minor.

The above indicates the great potential of essential oils as sources of bioactive molecules, however it is important to consider the complex chemical composition of these natural products, and the interaction of these to have a certain activity. So, the mechanism of action of essential oils is difficult to understand and in some cases is not completely elucidated. In fact, it has been reported that some essential oils have a synergistic effect [44-49]. An example of this is the use of essential oils in the development of biopesticides with different mechanisms of action and that often exhibit mutual synergistic relationships, which can be effective in preventing the development of populations of pathogens and resistant pests. However, it is important to establish relationships between individual substances in EOs and the effects of sublethal concentrations in white and non-white organisms [50]. In addition, essential oils are very useful, although it is a challenge to identify if a certain action is by individual components or by mixtures of them, as well as to elucidate their mechanism of action.

CONCLUSIONS

In summary, EOs are an excellent source of metabolites with a wide range of bioactive molecules that can be used in different areas of our lives, because they have been shown to be safe for humans and the environment.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank at the University of Sucre, University of Cartagena and Center of Commerce and Services, Regional Bolivar, SENA

REFERENCES

1. L. Neiro, J. Olivero, E. Stashenko. Repellent activity of essential oils: A review, *Bioresour. Technol.* **101**(1), 372-378 (2010).
2. A. Martínez, Aceites esenciales. Universidad de Antioquia (2001). Available in: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>, Accessed December 17, 2011.
3. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils. A review, *Food Chem. Toxicol.*, **46**(2), 446-475 (2008).
4. G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chem.*, **91**(4), 621-632 (2005).
5. G. Lee, Y. Kim, H. Kim, L.R. Beuchat, J.H. Ryu, Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts, *Int. J. Food Microbiol.*, **265**, 49-54 (2018).
6. J. Martínez, B. Sulbarán, J. Ojeda, A. Ferrer, R. Nava, Actividad antimicrobiana del aceite esencial de la mandarina, *Rev. Fac. Agronom.*, **20**, 502-512 (2003).
7. F. Deba, T. Xuan, M. Yasuda, S. Tawata, Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*, *Food Control*, **19**(4), 346-352 (2008).
8. H. Bailey, D. Levy, L. Harris, J. Schink, F. Foss, P. Beatty, S. Wadler, A Phase II Trial of Daily Perillyl ACLOhol in Patients with Advanced Ovarian Cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96, *Gynecol. Oncol.*, **85**(3), 464-468 (2002).
9. M. Osorio-Fortich, G. Matiz-Melo, G. León-Méndez, D. López-Olivares, N. Pájaro-Castro, Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **46**(2), 176-187 (2017).

10. G. León-Méndez, M. Osorio Fortich, M. Torrenegra-Alarcón, J. Gil, Extraction, characterization and antioxidant activity of essential oil from *Plectranthus amboinicus* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 4 (2015).
11. D. Marcano, M. Hasegawa, Aceites esenciales. En: "Fitoquímica orgánica". Editorial Torino. Segunda edición. Venezuela, Caracas, 2002, pp. 237-317.
12. S. Juglal, R. Govinden, B. Odhav. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi, *J. Food Prot.*, **65**(4), 683-687 (2002).
13. M. Torrenegra-Alarcón, N. Pájaro-Castro, G. León-Méndez, Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **46**(2), 160-175 (2017).
14. M. Torrenegra-Alarcón, C. Granados-Conde, M. Durán-Lengua, G. León-Méndez, X. Yáñez-Rueda, C. Martínez, N. Pájaro-Castro, The chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Minthostachys mollis*, *Orinoquia* **20**(1), 69-74 (2016).
15. G. Matiz-Melo, G. León-Méndez, M. Osorio Fortich, In vitro antibacterial activity of nineteen essential oils against acne-associated bacteria, *Rev. Cubana Farm.*, **49**, 1 (2015).
16. F.M. Ferreira, C.C. Delmonte, T.L.P. Novato, C.M.O. Monteiro, E. Daemon, F.M.P. Vilela, M.P.H. Amaral, Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*, *Med. Vet. Entomol.*, **32**(1), 41-47 (2018).
17. A.K. Tripathi, V. Prajapati, N. Verma, J.R. Bahl, R. Bansal, S. Khanuja, S. Kumar, Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* (var. ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera), *J. Econ. Entomol.*, **95**(1), 183-189 (2002).
18. E. Enan, Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **130**(3), 325-337 (2001).
19. S. Kpoviessi, J. Bero, P. Agbani, F. Gbaguidi, B. Kpadonou-Kpoviessi, B. Sinsin, G. Accrombessi, M. Frédérich, M. Moudachirou, J. Quetin-Leclercq, Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four Cymbopogon species from Benin, *J. Ethnopharmacol.*, **151**(1), 652-659 (2014).

20. J. Olivero-Verbel, N. Pájaro-Castro, E. Stashenko, Actividad antiqúorum sensing de aceites esenciales aislados de diferentes especies del género *Piper*, *Vitae*, **18**(1), 77-82 (2011).
21. P. Schnitzler, K. Schon, J. Reichling, Antiviral activity of Australian tea tree oil and Eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture, *Pharmazie*, **56**(4), 343-347 (2001).
22. R. Kumar, P. Om, K.P. Anil, K. Mahesh, A.I. Valary, S. Lech, Chemical composition and antiinflammatory, anti-nociceptive and antipyretic activity of rhizome essential oil of *Globba sessiliflora* Sims. collected from Garhwal region of Uttarakhand, *Int. J. Herb. Med.*, **8**(1), 59-69 (2017).
23. J. Grassmann, S. Hippeli, K. Dornisch, U. Rohnert, N. Beuscher, E.F. Elstner, Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their antiinflammatory effects, *Arzneimittelforschung*, **50**(2), 135-139 (2000).
24. M. Sayyah, J. Valizadeh, M. Kamalinejad, Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobil* against pentylenetetrazole and maximal electroshock-induced seizures, *Phytomedicine*, **9**(3), 212-216 (2002).
25. N. Tabanca, S.I. Khan, E. Bedir, S. Annavarapu, K. Willett, I.A. Khan, N. Kirimer, K.H. Baser, Estrogenic activity of isolated compounds and essential oils of *Pimpinella* species from Turkey, evaluated using a recombinant yeast screen, *Planta Med.*, **70**(8), 728-735 (2004).
26. K. Bellassoued, A. Ben Hsouna, K. Athmouni, J. van Pelt, F. Makni Ayadi, T. Rebai, A. Elfeki, Protective effects of *Mentha piperita* L. leaf essential oil against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats, *Lipids Health Dis.*, **17**(1), 9 (2018).
27. L. Pudziulyte, M. Stankevicius, A. Maruska, V. Petrikaite, O. Ragazinskiene, G. Draksiene, J. Bernatoniene, Chemical composition and anticancer activity of *Elsholtzia ciliata* essential oils and extracts prepared by different methods, *Ind. Crops Prod.*, **107**, 90-96 (2017).
28. J.D. Toscano-Garibay, M. Arriaga-Alba, J. Sánchez-Navarrete, M. Mendoza-García, J.J. Flores-Estrada, M.A. Moreno-Eutimio, J.J. Espinosa-Aguirre, M. González-Ávila, N.J. Ruiz-Pérez, Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia*, *Sci. Rep.*, **7**, 11479 (2017).

29. R. Meneses, R. Ocazonez, J. Martínez, Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **8**, 8 (2009).
30. N. Pájaro-Castro, M. Flechas, R. Ocazonez, E. Stashenko, J. Olivero-Verbel, Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins, *Blacpma*, **14**(3), 141-155 (2015).
31. R. Ocazonez, R. Meneses, F. Torres, E. Stashenko, Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication *in vitro*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, **105**(3), 304-309 (2010).
32. R. Meneses, F. Torres, E. Stashenko, R. Ocazonez, Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, *Rev. Univ. Ind. Santander Salud*, **41**, 236-243 (2009).
33. R. Meneses, F. Torres, E. Stashenko, R. Ocazonez, Essentials oils from seven aromatic plants grown in Colombia: Chemical composition, cytotoxicity and in vitro virucidal effect on the dengue virus, *Int. J. Essent. Oil Ther.*, **3**, 1-7 (2009).
34. C. Duschatzky, M. Possetto, L. Talarico, C. García, F. Michis, N. Almeida, M. Lampasona, C. Schuff, E. Damonte, Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants, *Antivir. Chem. Chemother.*, **16**(4), 247-251 (2005).
35. C.C. García, L. Talarico, N. Almeida, S. Colombres, C. Duschatzky, E.B. Damonte, Virucidal Activity of Essential Oils from Aromatic Plants of San Luis, Argentina, *Phytother. Res.*, **17**(9), 1073-1075 (2003).
36. N. Pájaro-Castro, K. Caballero-Gallardo, J. Olivero-Verbel, Neurotoxic Effects of Linalool and β -Pinene on *Tribolium castaneum* Herbst, *Molecules*, **22**, 2052 (2017).
37. K. Caballero-Gallardo, N. Pino-Benitez, N. Pájaro-Castro, E. Stashenko, J. Olivero-Verbel, Plants cultivated in Choco, Colombia, as source of repellents against *Tribolium castaneum* (Herbst), *J. Asia Pac. Entomol.*, **17**(4), 753-759 (2014).
38. A. Nascimento, C. Camara, M. Moraes, Actividad fumigante de los aceites esenciales de *Schinus terebinthifolius* y sus componentes seleccionados frente a *Rhyzopertha dominica*, *Rev. Fac. Nac. Agronom. (Medellín)*, **71**(1), 8359-8366 (2018).
39. J. Sriti Eljazi, O. Bachrouch, N. Salem, K. Msaada, J. Aouini, M. Hammami, E. Boushih, M. Abderraba, F. Liman, J. Mediouni., Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Coriander fruit* against *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, and *Lasioderma serricorne*, *Int. J. Food Prop.*, **1**, 13 (2018).

40. R. Hernandez-Lambrano, N. Pájaro-Castro, K. Caballero-Gallardo, E. Stashenko, J. Olivero-Verbel, Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests, *J. Stored Prod. Res.*, **62**, 81-83 (2015).
41. K. Caballero-Gallardo, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent Activity of Essential Oils and Some of Their Individual Constituents against *Tribolium castaneum* Herbst, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(5), 1690-1696 (2011).
42. W. Wanzala, A. Hassanali, W. Mukabana, W. Takken, Repellent Activities of Essential Oils of Some Plants Used Traditionally to Control the Brown Ear Tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, *J. Parasitol. Res.*, **2014**, 434506 (2014).
43. A.M.D. Nascimento, T.D.S. Maia, T.E.S. Soares, L.R.A. Meneses, R. Scher, E.V. Costa, S.C.H. Cavlacanti, R. La Corte, Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus, *Neotrop. Entomol.*, **46**(2), 223-230 (2017).
44. J. Rivera, P. Crandall, C. O'Bryan, S. Ricke, Essential oils as antimicrobials in food systems. A review, *Food Control*, **54**, 111-119 (2015).
45. C. Granados, Y. Yáñez, G. Santafé, Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander, Bistua, *Rev. Fac. Cienc. Bás.*, **10**(1), 12-23 (2012).
46. G. León, M.R. Osorio, S.R. Martínez, Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus Sinensis* L., *Rev. Cubana Farm.*, **49**(4), 742-750 (2015).
47. G.E. Matiz-Melo, K.F. Fuentes-López, G. León-Méndez, Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **44**(2), 189-207 (2015).
48. M. Torrenegra, G. Matiz, G. León, J. Gil, Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné, *Rev. Cubana Farm.*, **49**(3), 512-523 (2015).
49. M. Torrenegra, C. Granados, M. Osorio, G. León, Method comparison of hydrodistillation microwave radiation-assisted (MWHDR) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*, *Inf. Tecnol.*, **26**(1), 117-122 (2015).

50. R. Pavela, G. Benelli, Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints, *Trends Plant Sci.*, **21**(12), 1000-1007 (2016).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

G. León-Méndez, N. Pájaro-Castro, E. Pájaro-Castro, M. Torrenegra-Alarcón, A. Herrera-Barros, Essential oils as a source of bioactive molecules, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 80-93 (2019).

Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda

César Joe Valenzuela Huamán^{1*}, Nerio Gongora Amaut¹, Marley Dueñas Aragón¹, Lida Velázquez Rojas¹, Alcides Ramos Calcina², Nelly Melinda Valenzuela Huamán³

¹Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Av. de La Cultura 773, Cusco 08000, Perú.

*Correo electrónico: qfjoes@gmail.com

²Universidad Nacional del Altiplano Puno, Facultad de Ingeniería Estadística e Informática, Av. de La Cultura 773, Cusco 08000, Perú.

³Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Av. de La Cultura 773, Cusco 08000, Perú.

Recibido para evaluación: 10 de agosto de 2018

Aceptado para publicación: 14 de diciembre de 2018

RESUMEN

Con el objetivo de demostrar el efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua sobre los parámetros seminales y su toxicidad aguda en ratones albinos, se utilizó dos grupos experimentales y un grupo control. Los ratones fueron sacrificados, después de 7 días, luego de recibir los dos tipos de extractos, realizando posteriormente el conteo de espermatozoides utilizando la cámara y el método de Neubauer. Los extractos aplicados por vía intraperitoneal, afectaron la cantidad de espermatozoides en ratones, obteniendo: que el grupo que recibió el extracto clorofórmico presentó disminución del 79,9% en el número de espermatozoides y el grupo con diclorometano presentó disminución del 77,1%, ambos con respecto al grupo control.

Palabras claves: Extracto, parámetros seminales, espermatogénesis intraperitoneal, toxicidad aguda.

SUMMARY

Effect of dry chloroformic and dichloromethane extracts of *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua on seminal parameters and acute toxicity

With the goal of proving the effect of chloroformic and dichloromethane dry extracts from *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua, on the seminal parameters and its acute toxicity in albino mice. It was used two experimental groups and a control group. The mice were sacrificed, after 7 days while they were receiving the two kinds of extracts, making after that a sperm count, using for that the Neubauer's method and camera. The extracts, applied intraperitoneally, affect the amount of sperm on mice, getting: The group that received the chloroform extract showed a 79.9% decrease in the number of spermatozooids and the group that received the dichloromethane extract showed a decrease of 77.1%, both with respect to the control group.

Key words: Extract, seminal parameters, spermatogenesis, intraperitoneal, acute toxicity.

INTRODUCCIÓN

El *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua es una planta nativa, usada por los antiguos peruanos en la alimentación. El padre Bernabé Cobo en sus escritos hace referencia a esta planta, señalando que “tiene la virtud esta raíz de reprimir el apetito venéreo” [1].

La espermatogénesis es el proceso de formación de los espermatozoides, gametos masculinos, que comienza con la división de las espermatogonias y finaliza con la formación de espermatozoides [2, 3]. En el ratón adulto este proceso tiene una duración de 34 a 35 días [4-6].

El *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua actualmente, tiene importancia para satisfacer la alimentación de los habitantes en los Andes altos [7], pero su consumo no es solo por el alto valor nutricional que posee, sino también por los efectos que presenta sobre el ímpetu sexual [1]. La espermatogénesis es un proceso fisiológico fundamental en el varón, para dar lugar a la reproducción humana, su unidad funcional es el espermatozoide que contiene los gametos masculinos [7, 8].

Existen antecedentes históricos que indican que los ejércitos del inca se alimentaban de mashua, presuntamente para inhibir su ímpetu sexual, al reducir los niveles de testosterona, es decir, que tiene propiedades anafrodisiacas [1], actualmente los comuneros consumen este producto no sólo por su alto valor nutritivo sino, además, por el efecto

de inhibir la libido. Hasta el momento no se ha comprobado el efecto de la planta de *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua sobre la espermatogénesis, ya que para la iniciación de este proceso es necesario la intervención de la hormona testosterona, edad, cambios fisiológicos [7, 9, 10].

El presente trabajo tiene como objetivo determinar científicamente el efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua sobre la cantidad de espermatozoides en ratones albinos, y determinar la posible toxicidad aguda de esta especie vegetal en ratones albinos.

Al *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua se le atribuyen propiedades medicinales como: diurético, antiinflamatorio de la próstata, inhibidor de la libido en varones. Esta especie vegetal es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de dolencias genitourinarias, anemia y desordenes urinarios utilizándose básicamente bajo la forma de decocción del tubérculo [11, 12].

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objetivo de evaluar y determinar el efecto sobre la espermatogénesis en ratones albinos se realizó un estudio experimental con grupos para cada extracto seco clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R&P mashua. Es un diseño con preprueba y un grupo control. Para la toxicidad aguda se realizó un estudio experimental, pues los animales de experimentación fueron seleccionados aleatoriamente, de series cronológicas con múltiples grupos y un diseño con grupo control y sin preprueba.

La investigación del efecto sobre la espermatogénesis y toxicidad aguda son experimentales cuenta con un grupo control y los animales de experimentación se asignaron al azar. Se siguió para el conteo de los espermatozoides la técnica de conteo de glóbulos blancos [13, 14].

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos de cada uno de los indicadores sobre la espermatogénesis medidos para la evaluación y comparación del efecto entre los extractos, fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS. 21,0 (*Statistical Package for Social Science*). Se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Así mismo, posterior al ANOVA, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de medias, propuesta por Duncan, con el fin de detectar entre cuales grupos se ubican las diferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del porcentaje de humedad

Para la determinación el porcentaje de humedad se utilizó el siguiente método gravimétrico que consiste en la diferencia de pesos.

$$\%H = \frac{M1-M2}{M1} \times 100$$

Dónde: % H = porcentaje de humedad.

M1 = peso de muestra fresca.

M2 = peso de muestra seca

Tabla 1. Resultados del porcentaje de humedad de la especie vegetal *Tropaeolum Tuberosum R & P* mashua.

Especie vegetal	<i>Tropaeolum Tuberosum R & P</i> mashua		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Peso de muestra fresca (g)	10 g	10 g	10 g
Peso de muestra seca (g)	1,49 g	1,51 g	1,50 g
Porcentaje de humedad (%)	85,1%	84,9%	85%
Promedio % de humedad	85%		

Análisis, interpretación y discusión

Se analizaron tres muestras de los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum R & P* mashua, obteniéndose respectivamente, 85,1 %, 84,9% y 85% de porcentaje de humedad para cada muestra, luego se calculó el porcentaje de humedad promedio para las tres muestras, este valor fue del 85% de humedad.

Según A. Guerra [15] reporta el porcentaje de humedad de este tubérculo fue de 84,5%, mostrando similitud entre ambos estudios.

El valor de 85% de humedad indica que los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum R & P* mashua presentan un alto contenido de agua, por lo cual se debe señalar que el secado de la muestra debe realizarse cuidadosamente, trozando la muestra en pequeños fragmentos para que estos puedan liberar con mayor facilidad su contenido de agua, esto para evitar que proliferen formas de vida externas (hongos), ya que estos pueden alterar los metabolitos de la muestra vegetal.

Determinación del porcentaje de rendimiento

Tenemos la cantidad de producto obtenido en la extracción química.

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde: %E = porcentaje de rendimiento

Pf = peso final (extracto seco)

Pi = peso inicial (muestra molida)

Tabla 2. Resultados del porcentaje de rendimiento de la extracción de con los solventes de cloroformo y diclorometano de especie vegetal mashua.

	Ext. clorofórmico	Ext. de diclorometano
Peso inicial de muestra molida (g)	200 g	184 g
Peso final del extracto seco (g)	16 g	15,5 g
Porcentaje de extracción (%)	8 %	8,42 %

Análisis, interpretación y discusión

Donde el extracto de diclorometano presentó un porcentaje ligeramente mayor de rendimiento en comparación con el extracto clorofórmico, esto podría deberse al uso de solventes de diferente polaridad, puesto que el diclorometano es más polar que el cloroformo, estas observaciones nos indican que al usar solventes más polares se pueden obtener mayores porcentajes de rendimiento.

Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad se realizaron utilizando diferentes solventes de polaridad decreciente; obteniéndose los resultados consignados en la tabla 3.

Análisis, interpretación y discusión

Se utilizó el modelo P. Hurtado empleando una escala de solubilidad del solvente más polar al solvente más apolar [16, 17].

Mostrando los siguientes resultados de solubilidad de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua, se utilizaron solventes de polaridad decreciente que permitieron deducir la presencia de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos. El extracto clorofórmico es soluble en solventes apolares, debido a que el cloroformo es de naturaleza altamente apolar, por ende, este extracto será más soluble en solventes de su misma o similar naturaleza (hexano, benceno, éter etílico, cloroformo y diclorometano), poco soluble en solventes polares (metanol y etanol) e insoluble en agua.

Tabla 3. Pruebas de solubilidad de los extractos clorofórmicos y diclorometano de la especie vegetal mashua.

Solventes	Extracto clorofórmico	Extracto de diclorometano
Agua destilada	----	----
Metanol	+----	+---
Etanol 70%	+----	+---
Etanol 90 %	+----	+---
Acetato de etilo	++--	++--
Acetona	++--	++++
Diclorometano	++++	++++
Cloroformo	++++	++++
Éter etílico	++++	++++
Benceno	++++	++++
Hexano	++++	++++

Nota lectura de solubilidad:

++++: totalmente soluble

++++: parcialmente soluble

+++ -: poco soluble

+ ---: muy poco soluble

----: insoluble.

Así mismo, el extracto de diclorometano es soluble en solventes apolares, debido a que el diclorometano es de naturaleza apolar, aunque menos que el cloroformo, por lo cual dicho extracto será más soluble en solventes de su misma o similar naturaleza (acetona, diclorometano, cloroformo y éter etílico) y poco soluble en solventes polares (metanol y etanol) e insoluble en agua destilada.

Análisis fitoquímico cualitativo

En la determinación de metabolitos secundarios realizados en los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan en la tabla 4.

Análisis, interpretación y discusión

En el análisis fitoquímico del extracto seco clorofórmico de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua se determinó la presencia de abundantes triterpenoides y esteroides, moderada cantidad de: compuestos fenólicos, azúcares reductores, glucósidos, antraquinonas y naftoquinonas.

Tabla 4. Análisis fitoquímico cualitativo de los metabolitos secundarios de los extractos clorofórmico y de diclorometano de la especie vegetal de mashua.

Metabolito secundario	Reactivo	Extracto clorofórmico	Extracto de diclorometano
Azúcares reductores y glucósidos	Benedict	++-	+++
Aminoácidos	Ninhidrina	++-	+++
Comp. Fenólicos	Cloruro férrico	++-	++-
Flavonoides	Shinoda Amoniacó	++-	++-
Taninos	Gelatina-sal	---	---
Alcaloides	Dragendorff Mayer	---	---
Saponinas	Afrosimétrico	---	---
Triterpenoides y esteroides	Lieberman-Burchard	+++	+++
Antraquinonas-naftoquinonas	Borntrager	++-	++-

Nota lectura de metabolitos secundarios:

+++ : abundante cantidad

++ - : moderada cantidad

+ - - : escasa cantidad

- - - : ausencia.

Por otro lado, en el extracto seco de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua se determinó la presencia abundante de triterpenoides y esteroides, azúcares reductores y aminoácidos en abundante cantidad y en moderada cantidad se encontraron compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas y naftoquinonas.

Además, otros estudios de referencia como el del Instituto de Investigación Agropecuaria de Ecuador señalan que el *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua tiene en su composición abundantes compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos y aminoácidos, los cuales se encuentran en el análisis fitoquímico [18]; cabe resaltar que el análisis que se realizó en el trabajo de investigación, no muestra abundancia a diferencia de lo que refieren los estudios ya realizados, esto podría deberse a que los extractos son bastante apolares y los metabolitos son más solubles en solventes polares.

Del efecto sobre los parámetros seminales

Luego del tratamiento de los grupos experimentales con los extractos secos mashua, por un período de siete días, se realizó el recuento de espermatozoides. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación de espermatozoides ratón por ratón de los tres grupos: control, extracto clorofórmico y extracto de diclorometano.

Grupos de Ratones	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Promedio
Control	36,6 x 10 ⁶	37 x 10 ⁶	37 x 10 ⁶	35,4 x 10 ⁶	37 x 10 ⁶	36,6 x 10 ⁶
Extracto clorofórmico	7,8 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁶	7,6 x 10 ⁶	7,4 x 10 ⁶	7,72 x 10 ⁶
Extracto de diclorometano	8,0 x 10 ⁶	8,4 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁶	8,4 x 10 ⁶	8,24 x 10 ⁶

Nota: cuantificación y el promedio por grupo de los ratones después del tratamiento.

Análisis, interpretación y discusión

En el análisis cuantitativo de los espermatozoides podemos decir que en el grupo que fue tratado con el extracto seco clorofórmico de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua se produjo una disminución del 79,9% en el conteo de espermatozoides con respecto al grupo control.

De otro lado, el grupo que fue tratado con el extracto seco de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua tuvo una disminución del 77,1% en el conteo de espermatozoides con respecto al grupo control.

La mayor disminución de espermatozoides fue la del grupo tratado con el extracto seco clorofórmico en el que se observa una disminución del 79,9%, en cambio, el grupo tratado con el extracto seco de diclorometano presentó una disminución del 71,1% (respecto al grupo de control).

Así, es importante mencionar que los triterpenoides y esteroides comparten mucho de su estructura química ya que provienen de la misma ruta biosintética, estos forman parte de la porción lipídica insaponificable, y se extraen con disolventes halogenados habituales [19-21].

Es necesario en este punto revisar otros estudios relacionados con el tema de esta investigación. Por ejemplo, los estudios realizados por Uttam Kumar Das y colaboradores [22-25], en ratas, indican que los niveles bajos de testosterona en plasma inhiben las actividades de las enzimas esteroideas genitales, con lo que se produce la disminución del número de espermatozoides. En el caso de la presente investigación los triterpenoides y esteroides al ser de naturaleza esteroidal y precursores de hormonas, podrían afectar la actividad de las enzimas que se mencionan en el estudio.

Estudios reportados por J. Pino y R. Alvis (2009) [26, 27] en su trabajo de investigación *Efecto de Brugmansia arborea (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor*

masculino de ratón muestran resultados después del tratamiento de $5,440 \times 10^6 \pm 3,164 \times 10^6$, datos similares a los encontrados en el estudio con extractos secos clorofórmico y de diclorometano de especie vegetal *tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) *mashua*. Ambos mostraron disminución de los espermatozoides después de los tratamientos.

Además, algunos de los esteroides presentes en los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P *mashua*, podrían presentar una estructura similar a la de la testosterona, con lo cual podrían disminuir los niveles de gonadotropina, y así disminuir el conteo de espermatozoides

Del examen de espermograma

Luego del tratamiento de los grupos experimentales con los extractos *mashua*, se realizó un espermograma, la muestra que se utilizó para este examen fue el homogeneizado obtenido a partir de las colas de los epidídimos de los ratones pertenecientes a cada grupo de experimentación, estos resultados se muestran a continuación.

El examen macroscópico se realizó con el método de conteo de la cámara de Neubauer, siguiendo el protocolo de conteo de glóbulos rojos. Homogenizando las colas de epidídimo de los ratones [25].

Tabla 6. Examen macroscópico de la solución de los epidídimos de los ratones, de los tres grupos de estudio control, extracto clorofórmico y extracto de diclorometano de la especie vegetal *mashua*.

Grupos de ratones	Color	Turbidez	pH
Control	Ligeramente blanco	Escasa	7,1
Extracto clorofórmico	Ligeramente blanco	Escasa	7,1
Extracto de diclorometano	Ligeramente blanco	Escasa	7,1

Nota: exámenes realizados en los espermograma.

Análisis, interpretación y discusión

En el examen macroscópico, realizado en el homogeneizado de las colas de los epidídimos para cada grupo de experimentación, podemos apreciar que no existe mayor diferencia entre los grupos experimentales y el grupo control, este hecho podría deberse a que se trabajó con los homogeneizados, los cuales fueron preparados en 0,5 mL de solución fisiológica, esta tiene un pH de 7, por lo tanto al añadir las colas de los epidídimos y homogeneizarlas el pH de la solución fisiológica no se altera de manera significativa.

Respecto al color y la turbidez de las muestras, todas presentaron un color ligeramente blanco y una escasa turbidez, esto también podría deberse a que se trabajaron en medio de solución fisiológica, utilizándose para cada muestra la misma cantidad de esta

solución. Por lo tanto, el grupo control y los grupos experimentales no presentan mayores diferencias macroscópicas.

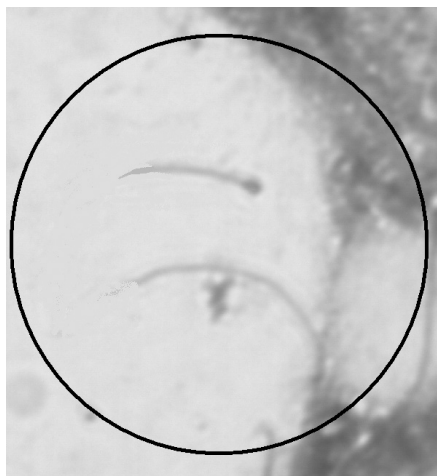


Figura 1. Espermatozoide de ratón.
Laboratorio de Oficina Criminalística
Cusco Policía Nacional del Perú.
Fuente: elaboración propia.



Figura 2. Espermatozoide humano.
Laboratorio de Oficina Criminalística Cusco, Policía Nacional del Perú.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 7. Examen microscópico de los espermatozoides de los ratones mostrados en los grupos de control, extracto clorofórmico y extracto de diclorometano de la especie vegetal mashua.

Grupos de ratones	Movilidad	Morfología
Control	Nula	Normal
Extracto clorofórmico	Nula	Normal
Extracto de diclorometano	Nula	Normal

Nota: observación de los espermatozoides en los laboratorios de la policía Nacional del Perú, Cusco.

Análisis, interpretación y discusión

Podemos apreciar que en los dos grupos experimentales al igual que en el grupo control la movilidad de los espermatozoides es nula, esto podría deberse al proceso del homogeneizado durante el cual se trabajó a una temperatura ambiente, sin tomar en cuenta la temperatura corporal de los ratones. Así mismo, cabe mencionar que para realizar la observación microscópica se realizó previamente una tinción con cristal violeta [28-31], este colorante podría haber fijado los espermatozoides en la lámina porta objetos, evitando su normal movilidad.

En conclusión, al observar la morfología de los espermatozoides en los dos grupos experimentales no se observaron formas anormales en comparación a la morfología observada en el grupo control.

En la figura 2 observamos un espermatozoide de ratón y en la figura 3 observamos un espermatozoide humano, comparando ambas figuras podemos apreciar que la morfología de los espermatozoides de los ratones no difiere de la de los seres humanos, salvo en el tamaño que según la bibliografía en los ratones es de 8 micras y en el ser humano de 45 micras, esta diferencia de tamaño hace que en el espermatozoide humano se pueda apreciar y diferenciar con mucha claridad las partes de un espermatozoide (cabeza, cuello y cola).

Análisis estadístico

Tomando en cuenta como factor al grupo control

Tabla 8. Cuantificación de espermatozoides de los grupos control, extracto clorofórmico y extracto de diclorometano de mashua.

Grupos de ratones	Control	Extracto clorofórmico	Extracto de diclorometano
Ratón 1	36,6 x 106	7,8 x 106	8,0 x 106
Ratón 2	37,0 x 106	7,8 x 106	8,4 x 106
Ratón 3	37,0 x 106	8,0 x 106	8,2 x 106
Ratón 4	35,4 x 106	7,6 x 106	8,2 x 106
Ratón 5	37,0 x 106	7,4 x 106	8,4 x 106
Promedio	36,6 x 106	7,72 x 106	8,24 x 106

Tabla 9. Cuantificación de espermatozoides divididos entre 106 para el análisis estadístico.

Grupos de ratones	Control	Extracto clorofórmico	Extracto de diclorometano
Ratón 1	36,6	7,8	8
Ratón 2	37	7,8	8,4
Ratón 3	37	8	8,2
Ratón 4	35,4	7,6	8,2
Ratón 5	37	7,4	8,4

Tabla 10. Análisis de estadísticas básicas de los grupos de ratones: control, extracto clorofórmico y extracto de diclorometano de la especie vegetal mashua.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	5	183	36,6	0,48
Extracto clorofórmico	5	38,6	7,72	0,052
Extracto de diclorometano	5	41,2	8,24	0,028

Cuantificación de Espermatozoides

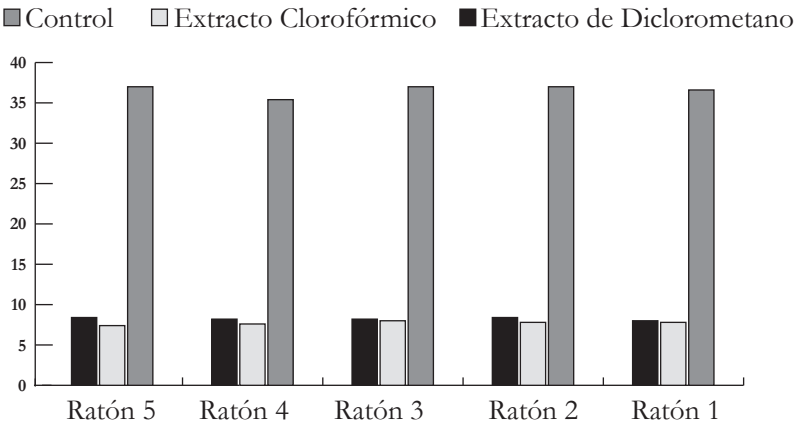


Figura 3. Cuantificaciones de espermatozoides de los ratones de los grupos de extractos (clorofórmico y de diclorometano) y el grupo control.

Tabla 11. Análisis de varianza de todos los tres grupos estudiados.

F.V.	S.C.	G.L.	CME	Fc	P	Ft
Entre grupos	2731,024	2	1365,512	7315,24286	3,0297E-19	3,88529383
dentro de los grupos	2,24	12	0,186666667			
Total	2733,264	14				

Promedio general = 17,52

$$\text{C.V. (\%)} = 1,07$$

Nos indica que únicamente el 1,07% de los datos no son representados por la media general, de esto se puede concluir que los datos son altamente confiables.

i) Decisión

Como $p < \alpha$, entonces se rechaza H_0 .

ii) Conclusión

Como $p = 0,000000 < 0,01$ (1%), entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0), y aceptamos la hipótesis alterna lo que podemos decir que existe una diferencia altamente significativa entre los dos tipos de extractos y el grupo control aplicados a los ratones.

De la toxicidad aguda

Al realizar la prueba de toxicidad aguda con los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua se obtuvieron los resultados consignados en la tabla 12.

Teniendo como referencia a Loomis y otros autores [32, 33] para la determinación de la toxicidad aguda por vía oral en ratones albinos sometidos a dosis crecientes de extracto seco de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua, según el criterio de Williams se comprobó que el extracto es prácticamente atóxico hasta la dosis de 16.000 mg/kg de peso, de lo cual se deduce que la dosis letal media está por encima de esta medida, dosis que por ser muy elevada no se llega a administrar a una persona con peso promedio de 70 kg. [10, 20].

El comportamiento de los ratones al administrarles las dosis correspondientes se observan en la tabla 12, donde se evidenció signos de estimulación los mismos que se aprecian por periodos cortos a partir de la dosis de 10.000 mg/kg; con dosis a partir de 16.000 mg/kg se observó disminución de la actividad motora los cuales también desaparecían al cabo de un tiempo. Al cabo de una semana de observación, los animales evidenciaron sus funciones vitales sin ningún tipo de alteración lo que comprueba que el extracto seco de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua aplicado por vía oral es atóxico.

Tabla 12. De la toxicidad aguda sometida por el extracto seco clorofórmico y de diclorometano en los ratones.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de ratones	Número de ratones muertos	Observaciones
1	500	4	0	Estado aparentemente normal
2	1000	4	0	Hociqueos entre ratones luego estado aparentemente normal
3	3000	4	0	Hociqueos entre ratones luego estado aparentemente normal
4	5000	4	0	Dan giros y estado aparentemente normal
5	7000	4	0	Dan giros y estado aparentemente normal
6	10.000	4	0	Se rascan y actividad motora disminuida
7	15.000	4	0	Se rascan y actividad motora disminuida
8	20.000	4	0	Actividad motora disminuida

CONCLUSIONES

Se determinó el efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua, sobre los parámetros seminales los cuales disminuyen la producción de espermatozoides, y presentan movilidad nula en ratones albinos y se determinó la toxicidad aguda de los extractos secos siendo ambos atóxicos en ratones albinos, según el criterio de Williams.

Se obtuvieron los extractos secos clorofórmico y de diclorometano a partir de los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua.

Se realizaron las pruebas preliminares (porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento, solubilidad y estudio fitoquímico) de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua, también se realizó exámenes de los parámetros seminales en la solución de los epidídimos de los ratones.

Finalmente, se concluye que la toxicidad aguda de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* R & P mashua en ratones albinos machos

es nula, considerándoseles atóxicos. Concluyéndose que la DL50 se encuentra por encima de la dosis de 20.000 mg/kg de peso corporal para ambos extractos, según el criterio de Williams.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. J. Soukup, "Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana", Editorial Salesiana, Lima, 1987, (4) pp. 49-96.
2. A. Caille, "Efecto de la osmolalidad sobre la habilidad fecundante del espermatozoide humano: un modelo de estudio *in vitro*", Universidad Nacional de Rosario, 2012, pp. 17-20.
3. A. Guyton, J. Hall, "Tratado de fisiología médica", Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, España, 2001, ed. 10, pp. 2444- 2480.
4. C. Sorbazo, O. Bustos, Acute effect of parathion on the seminiferous epithelium of immature mice, *Revista Chilena de Anatomía*, **18**(1), acta 61-68 (2000).
5. J. Pino y R. Alvis, Efecto de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor masculino de ratón, *Revista Peruana de Biología*, **15**(2), 125-127 (2009).
6. U. Kumar, R. Maiti, D. Jana & D. Ghosh, Effect of Aqueous Extract of Leaf of *Aegle marmelos* on Testicular Activities in Rats, *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, **5**, 21-25 (2006).
7. W. Ganong, "Fisiología básica y clínica", Editorial El Manual Moderno, México, 1995, 15 ed., pp. 301-391.
8. R. Murray, P. Mayes, D. Granner y V. Roswell, "Bioquímica de Harper", Editorial El Manual Moderno, México, 1992, ed. 12, pp. 97-101.
9. R. Murray, P. Mayes, D. Granner y V. Roswell, "Bioquímica de Harper", Editorial El Manual Moderno, México, 1992, 12 ed., pp. 234-388.
10. F. Vásquez y D. Vásquez, Espermograma y su utilidad clínica, *Revista Científica Salud Uninorte*, **23**(2), 220-230 (2007).

11. A. Brack, Cronología de los cultivos y sus centros de origen en el Perú, URL: http://www.peruecologico.com.pe/esp_cultivosincas_crono.htm, consultado mayo de 2010.
12. A. Grau, R. Ortega, C. Nieto, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 25. Mashua, URL: https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Mashua__Tropaeolum_tuberosum__Ru%C3%ADz__amp__Pav._880.pdf, consultado febrero 2010.
13. E. Dueñas, “Efecto in vitro de *Escherichia coli* uropatógena en la calidad espermática humana”, Tesis pregrado, Universidad Ricardo Palma, 2018, pp. 29- 30.
14. L. Rodríguez, B. Ambrosius y E. Fumuso, “Azoospermia, como causa de infertilidad en padriño”, Tesis pregrado, Universidad Nacional del centro de la provincia de Buenos Aires, 2018, pp. 24-25.
15. A. Guerra, “Estudio de la utilización de la harina de mashua (*tropaeolum tuberosum*) en la obtención del pan de molde”, Tesis pregrado, Universidad Tecnológica Equinoccial, 2014, pp. 13.
16. P. Hurtado, B. Jurado, E. Ramos, M. Calixto, Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *juglans neotropica diels* (nogal peruano), *Revista Sociedad Química Perú*, **81**(3), 2015.
17. W. Cruz y J. Arroyo, Efecto del extracto etanólico de maca (*lepidium meyenii walp*) sobre los niveles de testosterona y el conteo de espermatozoides de ratones machos, *Revista Médica Panacea*, **2**(1), 2-6 (2012).
18. J. Bruneton, “Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales”, Editorial Acribia, España, 2001, ed. 2, pp. 455-772.
19. A. Villar, “Farmacognosia general” , Editorial Síntesis S, 3 ed. Zaragoza España 1999, pp. 71-72.
20. K. Thomas, A. Caxton, A. Elujoba and O. Oyelola, Effects of an aqueous extract of cotton seed (*Gossypium barbadense* Linn.) on adult male rats, *Advances in Contraception*, **7**, 353-362 (1991).
21. A. Salame, A. Castro, I. Salgado, E. Mendieta, J. Herrera y J. Ramírez, Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis, allen & chapman*, 1897) de diferentes clases de edad, *Acta Zoológica Mexicana*, **20**(2), 103-114 (2004).

22. U. Kumar, R. Maiti, D. Jana y D. Ghosh , Iraian Journal of Pharmacology & Therapeutics, by Razi Institute for Drug Research (RIDR), *IJPT* **5**,21-25 (2006).
23. J. Hardman, A. Goodman, “Las bases farmacológicas de la terapéutica”, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, 1996, ed. 9, pp. 1739-1776.
24. M. Litter, “Farmacología: experimental y clínica”, Editorial El Ateneo, Argentina, 1990, ed. 5, pp. 45-52.
25. F. Vásquez y D. Vásquez, Espermograma y su utilidad clínica, *Revista Científica Salud Uninorte*, **23**(2), 220-230 (2007).
26. J. Pino y R. Alvis, Efecto de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor masculino de ratón, *Revista Peruana de Biología*, **15**(2), 125- 127 (2009).
27. L. Acosta, V. Núñez, J. Vásquez, J. Pino y B. Shiga, Dosis única de ciclofosfamida disminuye la calidad espermática y el epitelio germinal masculino en ratones, *Revista Peruana de Biología*, **19**(2),193- 198 (2012).
28. M. Martínez, J. Betancourt, R. Ramírez, H. Barceló, R. Meneses, A. Lalnez, Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (caña santa), *Revista Cubana Plantas Medicinales*, **5**(3) (2000).
29. W. Cruz, K. Luján y U. Miranda, Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa balb-C53, *Revista ECIPERU*, **1**(1), 17-19 (2012).
30. O. Espinoza, H. Rodríguez, H. Kemble y C. Arriaza, Efecto del insecticida malathion sobre el epitelio germinativo de testículo de ratón Cf1, *Revista Asociación Interciencia Caracas*, **40**(8), 560-563 (2015).
31. J. Cuevas, R. García, R. Navarro, J. Jordán y J. Cuba, Efecto de la criptorquidia provocada sobre el parénquima de los testículos en ratones Balb/c, *Revista Panorama Cuba y Salud*, **8**(3), 21-25 (2013).
32. A. Loomis, “Fundamentos de toxicología”, 3 ed., Editorial Acribia, España, 2010, pp. 2-30.
33. C. Gisbert, A. Juan, “Medicina legal y toxicología”, Editorial Salvat S.A., España, 1995, ed. 4, pp. 919-929.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.J. Valenzuela-Huamán, N. Góngora-Amaut, M. Dueñas-Aragón, L. Velázquez-Rojas, A. Ramos-Calquina, N.M. Valenzuela-Huamán, Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) *mashua* sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 94-111 (2019).

Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria* *glabrata* (Say, 1818)

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, Jonas Batista Reis², Jeremias Caetano da Silva¹, Rayone Wesley Santos de Oliveira², Maria do Livramento de Paula³, Hilton Costa Louzeiro⁴, Victor Elias Moucherek Filho², Maria Alves Fontenele⁵

¹Diretoria de Ensino, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, 68440-000 Abaetetuba, PA, Brasil. Correio eletrônico: prbgomes@yahoo.com.br

²Departamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão- Campus São Luís, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

⁴Coordenação de Licenciatura em Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro, MA, Brasil.

⁵Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, 65915-240, Imperatriz, MA, Brasil.

Recebido em: 22 de agosto de 2018

Aceito em: 27 de dezembro de 2018

RESUMO

Este trabalho determina a toxicidade e o efeito moluscicida do óleo extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Para isso, o óleo essencial foi extraído quantitativamente por hidrodestilação. Em seguida, quantificações de seus componentes foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e a toxicidade e atividade moluscicida do óleo foram testadas, respectivamente, contra *Artemia salina* e caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

A concentração letal (CL_{50}) foi calculada a partir dos métodos Reed-Muench & Pizzi, respectivamente, para toxicidade e teste moluscicida. Os resultados das análises cromatográficas mostraram que o óleo possui 83% de eugenol (constituente majoritário) e 2,5% de humuleno (componente minoritário). Na avaliação de toxicidade, o óleo foi considerado moderadamente tóxico com uma CL_{50} de $162,1 \text{ mg.L}^{-1} \pm 2,80$, com intervalo de confiança de 95%, enquanto a atividade moluscicida apresentou concentração letal de 50% (CL_{50}) de $18,62 \text{ mg.L}^{-1} \pm 2,18$,

com intervalo de confiança de 95%. Portanto, o óleo é ativo contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*.

Palavras-chave: Eugenol, esquistossomose, compostos voláteis, hidrodestilação, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

SUMMARY

Evaluation of toxicity and molluscicidal activity of the essential oil *Cinnamomum zeylanicum* Blume against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

This work determines the toxicity and the molluscicidal effect of the oil extracted from the leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). For this, the essential oil was extracted quantitatively by hydrodistillation. Then, quantifications of its components were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS) and the toxicity and molluscicidal activity of the oil were tested, respectively, against *Artemia salina* and snails *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). The lethal concentration (LC₅₀) was calculated from the Reed-Muench & Pizzi methods, respectively, for toxicity and molluscicide testing. The results of the chromatographic analysis showed that the oil has 83% eugenol (majority constituent) and 2.5% humulene (minority component). In the toxicity evaluation, the oil was considered to be moderately toxic with a LC₅₀ of 162.1 mg.L⁻¹ ± 2.80, with a 95% confidence interval, while the molluscicidal activity presented a lethal concentration of 50% (LC₅₀) of 18.62 mg. L⁻¹ ± 2.18, with a 95% confidence interval. Therefore, the oil is active against the snail *Biomphalaria glabrata*.

Key words: Eugenol, schistosomiasis, volatile compounds, hydrodistillation, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cinnamomum* (canela) pertence à família Lauraceae, muitos dos quais são usados como temperos e aromatizantes [1]. Existem duas variedades principais de canela: o Ceilão ou a verdadeira canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), que é cultivada no Sri Lanka e sul da Índia, e cassia (*Cinnamom aromaticum* Ness), que é cultivada na China, Indonésia e Vietnã [2, 3].

Além de sua utilidade na culinária, essas variedades são utilizadas na fitoterapia, devido à presença de taninos, mucilagem, açúcar, resinas e óleos essenciais. Dentre estes componentes o mais importante é o óleo essencial. Estudos apontam que o óleo possui em sua maior parte o cinamaldeído e este é responsável pelo sabor e o aroma da canela [4, 5]. No entanto há diferenças quanto a isso, em relação à variedade e as partes da planta. Estudos realizados com óleos essenciais extraídos das cascas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume mostraram de 60 a 80% de cinamaldeído e 2% de eugenol, enquanto que nas folhas a composição do eugenol é maior, em torno de 60 a 75% [6-8]. Já óleos essenciais extraídos da variedade *Cinnamomum aromaticum* Ness mostraram a presença de 80 a 90% de cinamaldeído com pouco ou nenhum eugenol [3].

Devido a elevada composição de eugenol no óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume, questiona-se a atividade moluscicida deste óleo frente ao *Biomphalaria glabrata* (Say 1818). Estudos realizados com o eugenol, timol e linalol mostraram que estes possuem atividade moluscicida contra *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus*, sendo estes, respectivamente, hospedeiros intermediários do parasita *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium*, transmissores da doença esquistossomose [9]. Além disso, sabe-se também que o eugenol possui outras atividades, tais como: larvicida [10], antimicrobiana [11], antioxidante [12], anti-inflamatório [12], antifúngico [13], antinociceptivo [14], citotóxica [15].

No Brasil, os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* pertencem ao gênero *Biomphalaria*. Até o momento, somente as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea* são infectadas, enquanto que as espécies *B. amazonica* e *B. peregrina* são consideradas hospedeiras em potencial, justamente por serem infectadas experimentalmente. No estado do Maranhão, observamos a ocorrência das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* em 30 e 39 municípios, respectivamente, principalmente na capital, São Luís [16].

Nesse caso, uma das medidas preventivas é uso de moluscicida. Os moluscicidas químicos mais utilizados são: hidróxido de cálcio, Gramaxone[®], Frescon[®] e Bayluscid[®] (niclosamida) [17]. No entanto, o uso destes é desvantajoso e isto acaba limitando sua utilização. Dentre estas, destacam-se: toxicidade para outras espécies, baixa seletividade, contaminação ambiental e resistência dos moluscos da espécie *B. glabrata*. Assim, há uma grande necessidade de encontrar novos moluscicidas, preferencialmente de origem natural, que sejam menos agressivo ao meio ambiente e mais seletivos [18, 19].

Portanto, neste trabalho, determinamos a atividade tóxica e moluscicida do óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) que são encontrados no Município de São Luís, Maranhão.

PARTE EXPERIMENTAL

Extração do óleo essencial

Obtemos as folhas da canela em supermercado da rede varejista de São Luís e levamos ao herbário. No Herbário Ático Seabra (SLS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) o *Cinnamomum zeylanicum* Blume, está registrado como pertencente à família das Lauráceas e número 1153.

Para a extração do óleo essencial do *Cinnamomum zeylanicum* Blume, utilizamos o extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e a uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração, pesamos 30 g da amostra e o triturávamos em um moinho elétrico. Após essa etapa, misturamos essa amostra com água destilada na proporção 1:10 e colocamos em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. Em seguida, ligávamos a manta elétrica e mantínhamos a temperatura em 100 °C. Após 5,0 horas encerrávamos a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). Realizamos essas operações em triplicatas e armazenamos as amostras em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração (15 °C) para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

Análises cromatográficas

Utilizamos a técnica cromatográfica em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap). O equipamento utilizado foi da marca Varian 2100, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1mL.min⁻¹; temperatura do injetor de 270 °C, split 1:50; coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 µm) e programação de temperatura do forno de 60 a 200 °C com taxa de aquecimento de 8 °C min⁻¹, e de 200 a 290 °C com taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹.

No espectrômetro de massas as temperaturas do mainfold, íon trap e da linha de transferência foram de 50 °C, 190 °C e 200 °C, respectivamente. Injetamos alíquotas de 1,0 µL (injetor automático CP-8410) nas amostras diluídas na proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano. Identificamos os componentes do óleo a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existente em bibliotecas de referência [20, 21].

Coleta dos caramujos

Coletamos as amostras de caramujos em criadouros naturais do bairro Sá Viana, periferia de São Luís, Maranhão. Capturamos os mesmos nos períodos chuvosos (janeiro

a junho de 2010), utilizamos EPI's (equipamento de proteção individual): luvas, bota sete léguas e pinça metálica. A técnica de coleta consiste em raspar com a concha as áreas submersas; colocamos os caramujos em um recipiente de vidro com tampa e água do próprio criadouro [22]. A busca dos mesmos foi realizada em diversos pontos de cada criadouro, a fim de obtermos uma boa amostragem. Após as coletas, estas foram etiquetadas por criadouro e levadas para análises.

Teste de positividade parasitária para caramujos

Em um recipiente de 30 mL de capacidade, adicionamos 25 mL de água desclorada e cinco caramujos. Após isso, levamos essa mistura para exposição da luz (lâmpadas de 100 W) a uma distância de 30 cm, durante 1 h, para estimular a liberação das cercárias [23]. Após essa exposição, visualizamos os caramujos com uma lupa estereoscópica (8x) para identificar e separar os que estavam parasitados dos que não estavam. Selecionamos para o teste de atividade moluscicida os caramujos que não apresentaram sinais de infecção pelo trematódeo no período de 30 dias.

Após isso, em um recipiente de poliestireno, adicionamos água desclorada e os caramujos; em seguida, esses foram alimentados com alface hidropônico para futuro teste da atividade moluscicida. Ressaltamos que o período de análise desse teste foi por sete dias, em um período de um mês.

Teste de atividade moluscicida

Realizamos essa atividade de acordo com descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO), somente com os caramujos que não estavam parasitados no teste de positividade. Para isso, o óleo essencial obtido nesse estudo foi utilizado em dois testes, sendo estes realizados em triplicata. No primeiro, denominado de teste piloto, em cada béquer de 500 mL, diluímos o óleo essencial em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 na concentração de 100 mg.L⁻¹; em seguida, adicionamos 10 caramujos adultos, negativos para *Schistosoma mansoni*, a fim de obtermos uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. Expulsemos a solução por 24 h, sob temperatura ambiente e após esse período, removemos, lavamos os caramujos duas vezes com água desclorada e os colocamos em cada béquer com 500 mL de água desclorada. Estes foram alimentados com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade [24].

No segundo teste, denominado de concentração letal (C_L), em cada béquer de 500 mL, diluímos o óleo essencial em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 nas concentrações de 75, 50, 25 e 10 mg.L⁻¹, a fim de obtermos uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. Expulsemos a solução por 24 h, sob temperatura ambiente e após esse período, removemos, lavamos os caramujos duas vezes com água desclorada

e os colocamos em cada béquer com 500 mL de água desclorada. Estes foram alimentados com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade [24].

Para o teste controle, realizamos dois testes. No primeiro, em um recipiente de vidro, imergimos em 500 mL de água desclorada 10 caramujos; no segundo, em um recipiente de vidro, adicionamos 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água desclorada e imergimos 10 caramujos. Nas duas situações, alimentamos os caramujos com alface hidropônico e procedemos a análise igual a realizada nos testes de concentração letal e piloto.

Consideramos os moluscos mortos àqueles cuja massa cefalopodal estava retraída para o interior da concha, liberando a hemolinfa ou então inchando e estendendo o cefalópode para fora da concha [25].

Teste de toxicidade

Em um aquário com solução sintética (60 g de sal marinho/litro de água destilada), saturada com oxigênio a partir de bomba de ar, adicionamos os cistos de *Artemia salina* Leach. Antes disso, dividimos o aquário em dois compartimentos: um para os cistos e outro sob iluminação artificial (lâmpada de 100 W) para que haja a eclosão e o deslocamento dos cistos para esse compartimento [26]. Procedemos de acordo com o descrito na metodologia de Gomes e colaboradores [15].

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, adicionamos 20 mg do óleo essencial em 0,02 mg de Tween 80, completando-se o volume para 2 mL com salina artificial. Essa diluição foi feita para obtermos solução-mãe de 10 mg.mL⁻¹ e com uma concentração de 0,1% de Tween 80. Amostras de 5, 50 e 500 µL dessa solução-mãe foram transferidas para frascos com 5 mL de solução final, obtendo-se concentrações de 10, 100 e 1000 mg.L⁻¹, respectivamente. Em cada frasco, transferimos dez larvas na fase *náuplio* e realizamos o branco (solução salina) com 20 µL e o controle negativo (solução salina e tween 80 a 0,1%) com 20 µL. Após 24 horas de incubação, contamos as larvas vivas e consideramos mortas aquelas que estavam ausentes de movimentação.

Em relação ao critério de toxicidade, consideramos três tipos: altamente tóxicas (CL₅₀ menor que 80 mg.L⁻¹), moderadamente tóxicas (com CL₅₀ entre 80 a 250 mg.L⁻¹) e atóxicas (com CL₅₀ maior que 250 mg.L⁻¹) [27].

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed-Muench, o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, consequentemente, o animal que

morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de interseção entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos [28, 29].

O intervalo de confiança foi calculado a partir da construção do gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de “R”, que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável “h” que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} [30].

Utilizamos a Anova de único fator para avaliar associação da concentração do óleo essencial com mortalidade a nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análise cromatográfica do óleo essencial

A partir de comparações dos dados obtidos dos cromatogramas com os da biblioteca de referência [20, 21], identificamos e quantificamos a presença de quatro constituintes, sendo estes: Eugenol com 83,0% (componente majoritário), Cariofileno com 12,2%, Linalol com 3,0% e por último Humuleno com 2,5% (componente minoritário).

Avaliação do teste de toxicidade

Nesse estudo, observamos que a mortalidade foi 100% na concentração de 1000 mg.L^{-1} (ver tabela 1) e concentração letal (CL_{50}) de 162,1 mg.L^{-1} (ver figura 1).

Tabela 1. Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das folhas da canela

Concentração (mg.L^{-1})	Log Concentração	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. Vivos	Mortalidade (%)
1000	3	10	0	14	0	100
100	2	3	7	4	7	30
10	1	1	9	1	16	10

Número de larvas (n=10)

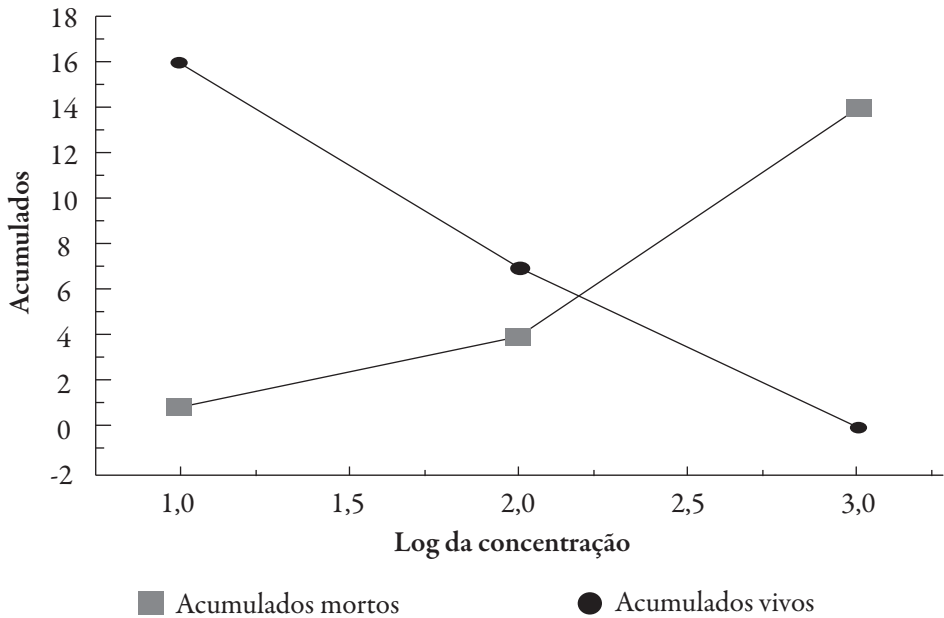


Figura 1. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas. (Logaritmo da concentração = 2,21, com um intervalo de confiança de 95% a 2,80 $mg.L^{-1}$).

Depois do período de exposição, ou seja, 24 horas, observamos que não houve mortalidade das larvas (ver tabela 2) para o teste controle.

Tabela 2. Avaliação da mortalidade do teste controle para as larvas da *Artemia salina*

Controle	Reagentes	Mortalidade
Branco 1	Solução salina	Todas as larvas ativas
Branco 2	Solução salina + tween 80 a 0,1%	Todas as larvas ativas

Avaliação da atividade moluscicida

No teste piloto com óleos essenciais do *C. zeylanicum* Blume na concentração de 100 $mg.L^{-1}$, observamos que a mortalidade porcentual dos caramujos foi máxima no tempo de 72 de horas. Essa concentração é ideal para considerarmos a atividade do óleo essencial em um tempo de 24 h [31].

No estudo para as concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10 $mg.L^{-1}$, observamos que a mortalidade foi máxima na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ (ver figura 2) e que há efeito da

concentração com mortalidade a nível de significância de $p < 0,05$ (Anova: $F = 1,91$; $p = 0,21$). A partir disso, constatamos que a concentração letal (CL_{50}) foi $18,62 \text{ mg.L}^{-1}$ (ver figura 3).

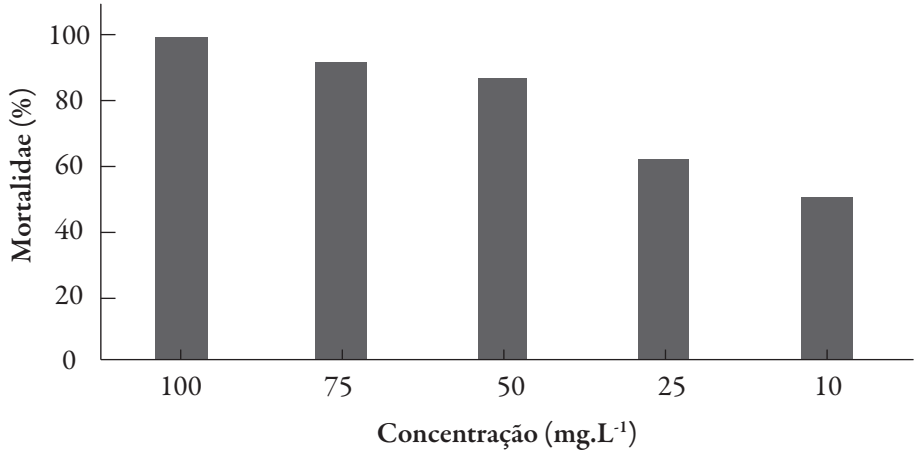


Figura 2. Avaliação da mortalidade em função da concentração.

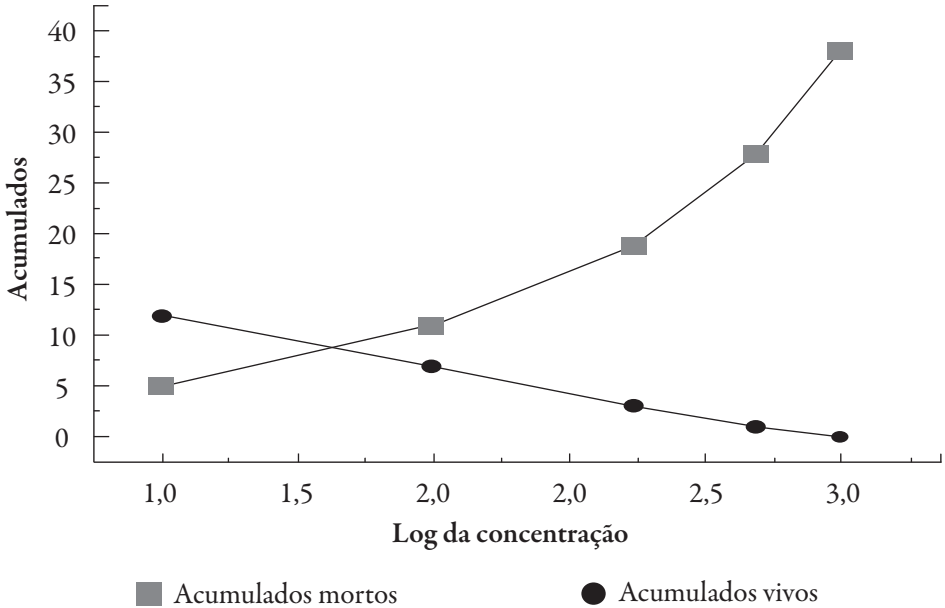


Figura 3. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas. Logaritmo da dose = 1,27, com um intervalo de confiança de 95% a $2,18 \text{ mg.L}^{-1}$.

Passados do período de exposição, observamos que não houve mortalidade dos caramujos (ver tabela 3) para o teste controle.

Tabela 3. Avaliação da mortalidade do teste controle para os caramujos.

Controle	Reagentes	Mortalidade
Branco 1	Água desclorada	Todos os caramujos ativos
Branco 2	Água desclorada + tween 80 a 0,1%	Todos os caramujos ativos

DISCUSSÃO

De fato, concluímos que o óleo essencial extraído das folhas de *C. Zeylanicum* Blume é constituído, majoritariamente, por eugenol e atribuímos a este componente a sua eficácia moluscicida contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. No entanto, este óleo essencial possui atividade tóxica moderada.

A composição de eugenol que obtemos em nosso estudo foi 83%. Apesar desse resultado está dentro da faixa, que é de 70 a 94% [32, 33], observamos em outros estudos diferenças na composição centesimal desse componente para a mesma espécie. Óleos de folhas coletadas no município de Manaus, Amazonas, e de duas árvores cultivadas em Morretes, que foram adubadas com matéria orgânica e com adubo químico, apresentaram eugenol em 60% [6, 34], apesar do estudo realizado [34] mostrar composições de outras partes da planta com valores de 90%. Assim a explicação que atribuímos para essas diferenças está nas variações espaço-temporais, tais como, temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, irradiância, genótipo, método de extração e condições agrônômicas que de alguma forma afetam o perfil químico do óleo essencial extraído para a mesma espécie de planta [35-38].

No presente estudo, o óleo essencial extraído das folhas *C. Zeylanicum* Blume exibiu atividade moluscicida contra o caramujo *B. glabrata* com concentração letal (CL_{50}) de 18,62 mg.L⁻¹. De acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) a atividade moluscicida é eficaz quando a concentração letal (CL_{50}), em um período de 24 h a uma determinada temperatura é inferior a 100 mg.L⁻¹ para vegetal bruto e 20 mg.L⁻¹ para extratos [31]. Dessa forma, os resultados do nosso estudo confirmam e ampliam o número de espécies da família *Lauraceae* que possuem atividade moluscicida. O estudo realizado por [39] comprovou a atividade moluscicida do óleo essencial *Ocotea bracteosa* (Meisn) Stem Bark contra o caramujo *B. glabrata* com concentração letal (CL_{50}) de 4,6 µg.mL⁻¹.

No entanto, esse critério não pode ser levado ao pé da letra. Quando se compara a eficácia da atividade moluscicida com concentração ou tempo nos capítulos do livro editado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) de 1987, observamos que há dualidade [40]. No capítulo *Guidelines for evaluation of plant molluscicides*, a atividade em moluscos aquáticos é eficaz quando a concentração for menor ou igual a 100 mg.L^{-1} e matar em 90% os caramujos em 24 horas sob temperatura constante. Em outro capítulo, as plantas que apresentam mortalidade de concentração em até 100 mg.L^{-1} são consideradas positivas, enquanto que superiores a essa são negativas, independente da porcentagem [41]. Apesar dessa dualidade na porcentagem, observamos o ponto comum a toda atividade moluscicida de óleos essenciais. Esta é eficaz quando for igual ou menor que 100 mg.L^{-1} .

Avaliar o teste de moluscicidade *in vitro* é essencial, porém quando complementado com o teste de toxicidade, este nos dá uma dimensão de como seria a ação desse óleo em um sistema real. Nesse contexto, estudos de toxicidade realizados com *Artemia salina* tem suas vantagens, que são: capacidade de formar cistos dormentes, fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico, além de ser um ótimo indicador para avaliar a interferência da substância com outros organismos. [42, 43]. Assim, o resultado do nosso estudo revelou toxicidade moderada do óleo essencial. A partir disso, concluímos que este óleo pode afetar outros organismos que não sejam alvos. Mas para isso é necessário a realização de estudos em campo para confirmar ou negar essa hipótese.

CONCLUSÃO

Concluímos que o óleo essencial da canela é constituído em sua maior parte pelo eugenol e que este componente possui atividade moluscicida contra os caramujos *Biomphalaria glabrata* e toxicidade moderada frente a *Artemia salina*. Portanto, esse óleo essencial pode afetar outros organismos que não sejam o caramujo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMA e ao CNPQ por financiarem essa pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. V. Jakhetia, R. Patel, P. Khatri, N. Pahuja, S. Garg, A. Pandey, S. Sharma, Cinnamon: a pharmacological review, *Journal of Advanced Scientific Research*, **1**, 19-23 (2010).
2. P. Ranasinghe, S. Perera, M. Gunatilake, E. Abeywardene, N. Gunapala, S. Premakumara, K. Perera, M. Lokuhetty, P. Katulanda, Effects of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) on blood glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model, *Pharmacognosy Research*, **4**, 73-9 (2012). DOI:10.4103/0974-8490.94719
3. B. Shan, Y.Z. Cai, J.D. Brooks, H. Corke, Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5484-5490 (2007). DOI:10.1021/jf070424d
4. T. Molania, A.A. Moghadamnia, M. Pouramir, S. Aghel, D. Moslemi, L. Ghassemi, M. Motalebnejad, The effect of Cinnamaldehyde on mucositis and salivary antioxidant capacity in gamma-irradiated rats (a preliminary study), *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**, 89 (2012). DOI:10.1186/2008-2231-20-89
5. D.W. Peterson, R.C. George, F. Scaramozzino, N.E. La Pointe, R.A. Anderson, D.J. Graves, J. Lew, Cinnamon Extract Inhibits Tau Aggregation Associated with Alzheimer's Disease In Vitro, *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, **17**, 585-597 (2009). DOI:10.3233/JAD-2009-1083
6. M. da P. Lima, M. das G.B. Zoghbi, E.H.A. Andrade, T.M.D. Silva, C.S. Fernandes, Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), *Acta Amazonica*, **35**, 363-366 (2005). DOI:10.1590/S0044-59672005000300009
7. V.N. Trajano, E. de O. Lima, A.E. Travassos, E.L. de Souza, Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**, 771-775 (2010). DOI:10.1590/S0101-20612010000300032
8. M. Vangalapati, S. Satya, S. Prakash, S. Avanigadda, A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **3**, 653-663 (2012)

9. A.T. Sharaf el-Din, Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt, *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **36** (2), 599-612 (2006)
10. P.R.B. Gomes, R.W.S. De Oliveira, V.E. Mouchrek Filho, A.A. do Nascimento, A.P. Everton, H.C. Louzeiro, J.B. Reis, M.A. Fontenele, Activity larvicide of the essential oil *Syzygium aromaticum* (Carnival-of-india) in front of the mosquito *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762), *Periodico Tche Quimica*, **15**, 184-195 (2018).
11. N. Sanla-Ead, A. Jangchud, V. Chonhenchob, P. Suppakul, Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films, *Packaging Technology and Science*, **25**(1), 7-17 (2012).
12. B. Yogalakshmi, P. Viswanathan, C.V. Anuradha, Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats, *Toxicology*, **268**, 204-212 (2010). DOI:10.1016/j.tox.2009.12.018
13. S.-Y. Wang, P.-F. Chen, S.-T. Chang, Antifungal activities of essential oils from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves, *Bioresource Technology*, **96**(7), 813-818 (2005).
14. A.N. Daniel, S.M. Sartoretto, G. Schmidt, S.M. Caparroz-Assef, C.A. Bersani-Amado, R.K.N. Cuman, Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**, 212-217 (2009). DOI:10.1590/S0102-695X2009000200006
15. P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, W. Ferreira-Rabêlo, A. Albuquerque do Nascimento, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M. Alves-Fontenele, Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**, 37-52 (2018).
16. O. dos S. Carvalho, P.M.Z. Coelho, H.L. Lenzi, Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2008.
17. S.P.D. Cantanhede, A. de M. Marques, N. Silva-Souza, A.L. Valverde, Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**, 282-288 (2010). DOI:10.1590/S0102-695X2010000200024
18. D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis, *The Lancet*, **383**, 2253–2264 (2014). DOI:10.1016/S0140-6736(13)61949-2

19. Jr. A. Gasparotto, M.A. Brenzan, I.C. Piloto, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura, D. Filho, B. Prado, E. Rodrigues Filho, A.G. Ferreira, Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae), *Química Nova*, **28**, 575-578 (2005). DOI:10.1590/S0100-40422005000400003
20. R.P. Adams, O.D. Sparkman, Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **18**, 803-806 (2007).
21. NIST 08. National Institute of Standards and Technology: Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH) (2008).
22. Ministério da Saúde Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da esquistossomose (PCE) 2008.
23. S.R. Smithers, R.J. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms, *Parasitology*, **55**, 695-700 (1965).
24. E.A. Malek, "Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual". Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization, Washington, D.C. U.S.A. 1985.
25. F.S. McCullough, P. Gayral, J. Duncan, J.D. Christie, Molluscicides in schistosomiasis control, *Bulletin of the World Health Organization*, **58**, 681-689 (1980).
26. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica*, **45**, 31-34 (1982).
27. C. B. D. Amarante, A. H. Müller, M. M. Póvoa, M. F. Dolabela, Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiplasmodial activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*), *Acta Amazonica*, **41**(3), 431-434 (2011).
28. S.M. Colegate, R.J. Molyneux, "Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination", Second Edition, CRC Press, 2007.

29. L.J. Reed, H. Muench, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, **27**, 493-497 (1938). DOI:10.1093/oxford-journals.aje.a118408
30. M. Pizzi, Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method, *Human Biology*, **22**, 151-190 (1950).
31. World Health Organization: Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva: TDR/SC, 1983.
32. E. Guenther, "The essential oils", Vol. 4, Van Nostrand Reinhold, 1950.
33. J. Purseglove, "Spices", Vol. 2. Longman, London, 1981.
34. M. Koketsu, S.L. Gonçalves, R.L. de O. Godoy, D. Lopes, N. Morsbach, Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná, *Food Science and Technology*, **17**, 281-285 (1997). DOI:10.1590/S0101-20611997000300017
35. K.H.C. Baser, G. Buchbauer, "Handbook of essential oils: science, technology, and applications", CRC Press, 2015.
36. A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J. Scheffer, Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, **23**, 213-226 (2008).
37. M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection*, **19**, 603-608 (2000).
38. C. Regnault-Roger, C. Vincent, J.T. Arnason, Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world, *Annual Review of Entomology*, **57**, 405-424 (2012).
39. D.F. Coutinho, C.S. Dias, J.M. Barbosa-Filho, M.F. Agra, R.M. Martins, T.M.S. Silva, E.V.L. da-Cunha, M.S. Silva, A.A. Craveiro, Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the Stem Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez., *Journal of Essential Oil Research*, **19**, 482-484 (2007). DOI:10.1080/10412905.2007.9699958
40. P. Jurberg, M.C. de Vasconcellos, N.M. Mendes, P. Jurberg, M.C. de Vasconcellos, N.M. Mendes, Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **84**, 76-83 (1989). DOI:10.1590/S0074-02761989000500008

41. N. Farnsworth, T. Henderson, D. Soejarto, Plants with potential molluscicidal activity. Presented at the meeting of the Scientific Working Group on Plant Molluscicides, UNDP/World Bank/WHO Spec. Prog. for Res. and Train in Trop Dis. Geneva, 31 Jan-2 Feb/edited by Kenneth E. Mott (1987).
42. P. Calow, Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. Hoffman, D. *et al.* Handbook in cytotoxicology. Oxford: Blackwell Scientific Publication. **1**, 1-5 (1993).
43. I.K. Utyama, Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto, *Revista Eletrônica de Farmácia*, **4**, (2007).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, J. Batista-Reis, J. Caetano da Silva, R.W. Santos de Oliveira, M. do Livramento de Paula, H. Costa-Louzeiro, V.E. Moucherek-Filho, M. Alves-Fontenele, Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 112-127 (2019).

Automedicación en estudiantes de la Sede Neiva de la Universidad Cooperativa de Colombia

Claudia Patricia Ortiz¹, Oscar David Fúnez David², Henry Rubiano Daza², Claudia Lorena García Rojas³, Carlos Alberto Calderón Ospina⁴, Daniel Ricardo Delgado^{2*}

¹Grupo de Investigaciones en Seguridad y Salud en el Trabajo (FET), Programa de Administración de la Salud Ocupacional, Fundación Escuela Tecnológica de Neiva, Km. 11 vía al Sur, Neiva-Rivera, Colombia.

²Grupo de Investigación Comunicación y Desarrollo del Huila, COMDEHUILA, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Neiva, Calle 11 No. 1-51, Neiva, Colombia.

*Correo electrónico: danielr.delgado@campusucc.edu.co

³Programa de Odontología, Universidad Antonio Nariño, Sede Neiva, Calle 19 # 42-98.

⁴Center for Research in Genetics and Genomics (CIGGUR). GENIUROS Research Group. School of Medicine and Health Sciences. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Recibido para evaluación: 4 de octubre de 2018

Aceptado para publicación: 5 de febrero de 2019

RESUMEN

La automedicación es una práctica riesgosa cuyas consecuencias incluyen enmascaramiento de una enfermedad, aparición de reacciones adversas, interacciones medicamentosas, aumento de la resistencia a ciertos tipos de fármacos y fármaco dependencia. La Organización Mundial de la Salud contempla la posibilidad de educar a la población en prácticas de automedicación responsable, señalando al profesional farmacéutico como figura clave de este proceso educativo. El presente trabajo analiza las conductas de automedicación en una población encuestada de 600 estudiantes de la Universidad Cooperativa de Colombia Campus Neiva. Los resultados de la encuesta han sido analizados en forma global y diferenciando a los encuestados en subgrupos de: a) programa académico y b) variables sociodemográficas. Los resultados indican que la automedicación es una práctica común en estudiantes de la Universidad Cooperativa de Colombia Campus Neiva que no siempre se lleva a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la OMS para poder considerarse una práctica responsable y segura.

Palabras clave: Automedicación, autoprescripción, farmacia comunitaria, estudiantes universitarios.

SUMMARY

Self-medication in the students from Neiva Campus of the Universidad Cooperativa de Colombia

Self-medication is a dangerous practice with consequences including masking of disease, adverse reactions to medications, drug interaction, resistance to certain types of therapeutic agents and drug dependence. The World Health Organization has considered the possibility of educating population in practices of responsible self-medication, pointing at the pharmacist as a key figure in this educational process. In the present work we have analyzed the self-medication conducts of 600 surveyed college students of the Universidad Cooperativa de Colombia Sede Neiva (UCC). The overall results of the survey have been analyzed; we have also divided the surveyed population in subgroups of: a) Academic program and b) Sociodemographic variables. Results indicate that self-medication is a common practice among college students of UCC, and that it is not always practiced according to WHO recommendations for responsible, safe self-medication.

Key words: Self-medication, self-prescription, community pharmacy, college students.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud indica que automedicación implica el uso de medicamentos por parte del consumidor para el tratamiento de trastornos o síntomas reconocidos por el propio paciente, o el uso intermitente o continuo de un medicamento formulado por un médico para enfermedades crónicas o recurrentes o síntomas [1]. La organización denominada Industria Mundial de la Automedicación (WSMI) define la automedicación como el tratamiento de problemas de salud comunes con medicamentos especialmente diseñados y etiquetados para su uso sin supervisión médica y aprobados como seguros y efectivos para tal uso [2].

De otro lado, una definición interesante es la propuesta por Ruiz, la cual involucra al grupo familiar al definirla como la selección y uso de medicamentos por parte de los individuos o un miembro de la familia de los individuos para tratar enfermedades autoreconocidas o autodiagnosticadas o sus síntomas no prescrito por un médico, o de forma que esta no es dirigida por un médico [3]. La definición presentada por la WSMI (World Self-Medication Industry) es la denominada automedicación responsable, la cual representa un área de la asistencia sanitaria en la que el paciente asume un mayor grado de responsabilidad en la gestión de una dolencia menor, mediante el uso

de un producto farmacéutico que está disponible sin receta médica. La práctica puede ser apoyada por el asesoramiento de un profesional de la salud. Esta participación propende a un manejo más racional de enfermedades menores con lo cual se podría evitar citas médicas innecesarias, lo que presenta ventajas para los sistemas de salud. Al aumentar el acceso a la medicación, la automedicación responsable puede contribuir a la reducción de costos de los medicamentos prescritos, asociados a los programas de salud financiados con fondos públicos [4].

Ahora bien, un número cada vez mayor de medicamentos sujetos a receta médica están disponibles como productos de venta libre en muchos países, ampliando así el alcance y la accesibilidad de estos productos a la población. Sin embargo, la automedicación responsable no está exenta de riesgos tales como un mal diagnóstico, el uso de una dosis excesiva del fármaco, la duración prolongada de uso, interacciones con otros medicamentos y polifarmacia, este último puede ser particularmente problemático en las personas mayores, por lo que a pesar de las ventajas asociadas al asesoramiento de los pacientes por parte del farmacéutico y el médico se transforma en un problema de salud pública cuando el individuo usa el medicamento sin asesoramiento o prescripción médica, situación que es muy común en nuestro medio [4, 5].

Estudios realizados sobre automedicación en estudiantes universitarios refleja la gran prevalencia de esta práctica en esta población lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar una intervención urgente, frente a los problemas que implica automedicarse de manera no responsable [6, 7]. Este documento expone la conducta de los estudiantes de la Universidad Cooperativa de Colombia de la Ciudad de Neiva, con el fin de identificar tendencia en automedicación e intervenir mediante campañas educativas a la población universitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. El cálculo de la muestra se realizó en Epidat versión 4.2, teniendo en cuenta los siguientes criterios: técnica de muestreo utilizada muestreo probabilístico tipo aleatorio simple, prevalencia de automedicación 60% (Boletín epidemiológico), nivel de confianza 95 % y error 5 %, con estos criterios se obtuvo un tamaño muestral de 600 estudiantes; la selección de los participantes se realizó de forma aleatoria de la base de datos de los estudiantes matriculados en la Universidad Cooperativa de Colombia Campus Neiva.

El cuestionario fue aplicado mediante formulario digital utilizando Tablet; se garantizó la calidad del dato, ya que los investigadores recolectaron de primera mano la información, obteniendo una efectividad del 100% en el diligenciamiento de cada encuesta.

También se realizó una prueba piloto a 50 estudiantes universitarios de una institución diferente con el ánimo de identificar posibles ambigüedades en cada una de las preguntas o dificultad para comprender las mismas. El formulario empleado fue anónimo con preguntas cerradas, de tipo elección múltiple y abiertas diseñadas para repuestas cortas y puntuales.

Las preguntas están orientadas a establecer: a) la prevalencia de la automedicación en estudiantes de la Universidad Cooperativa de Colombia Campus Neiva, b) el porcentaje de estudiantes que realizan una automedicación responsable (diagnóstico médico previo, lectura del prospecto, seguimiento estricto de la posología y duración del tratamiento estipulada en el prospecto, consume el medicamento en ausencia de bebidas alcohólica o energizantes) , c) establecer los grupos de medicamentos utilizados más frecuentemente por los estudiantes, d) determinar las indicaciones más frecuentes de los productos automedicados, e) establecer la frecuencia de la automedicación, f) determinar la fuente de la medicación, g) establecer las razones que con mayor frecuencia llevan a los estudiantes a la automedicación y h) describir el conocimiento de los estudiantes del riesgo asociado a la automedicación.

Para el análisis estadístico se utilizaron proporciones para las variables cualitativas. En el análisis bivariado se realizó la prueba de chi cuadrado para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las variables sociodemográficas (sexo, edad, pregrado, semestre cursado y estrato socioeconómico) y automedicación. Para establecer posibles asociaciones entre antecedentes patológicos y conductas que ponen en riesgo la salud del individuo con la automedicación se empleó el OR e intervalos de confianza del 95%, la significancia estadística se da por el valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La encuesta fue aplicada a 600 estudiantes mediante un cuestionario electrónico, en el cual cada pregunta se debía responder para avanzar a la siguiente, lo que garantizó una efectividad del 100% en el diligenciamiento del cuestionario. La prevalencia de automedicación en la Sede Neiva de la Universidad Cooperativa de Colombia fue del 86,8 %. De la población encuestada aproximadamente el 53% es de sexo masculino y el 47% de sexo femenino. En cuanto al programa académico que cursan lo encuestados, la mayoría pertenece a los programas de Derecho e Ingeniería Industrial en los cuales se encuentra cerca del 68 % de la población. De acuerdo con los resultados los programas académicos de Ingeniería de Sistemas (IS) y Contaduría Pública (CP) registran el menor número de individuos que se automedican (IS= 51% y CP=42% de su población) y los programas académicos de Administración de empresas (AE) y Psicología (Ps) en donde se presenta el mayor número de individuos que se automedican

con un porcentaje del 100%; estos programas representan el 1,8 y 9,3 % de la población encuestada respectivamente; otro dato relevante es el programa de Derecho (D), el cual presenta el mayor número de encuestados (240/600, 40%) en donde el 96,7% de su población se automedica y este a su vez representa el 38,7% de la población total.

En relación con las variables sociodemográficas, del 82,3% de los encuestados que toman medicamentos sin prescripción médica el 51,4 % es de sexo masculino y el 48,6% de sexo femenino. En cuanto a la edad de los participantes en el estudio, el rango se encuentra entre los 16 y 42 años siendo en su gran mayoría mayores de edad y tan sólo un 2,1 % (11 personas) son menores de edad, los cuales posiblemente pertenecen a los semestres iniciales. Si bien el rango de edad es amplio, en la tabla 1 se muestra que el número de participantes por semestre es muy homogéneo.

Finalmente, en cuanto al nivel socioeconómico la mayoría de la población pertenece a los estratos 2 y 3 con un 50,8 y 33,0 % respectivamente. Particularizando los encuestados que pertenecen al estrato dos el 67,1% de los mismos no se automedica, siendo el único estrato en donde se encuentra un menor porcentaje de individuos que consumen medicamentos sin prescripción médica.

Al realizar la prueba chi cuadrado para las variables presentadas en la tabla 1, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables sexo-auto-medicación y edad-automedicación, pero esta tendencia (automedicación) se encuentra relacionada con el programa académico, semestre cursado y el estrato socioeconómico, en donde χ^2 de la tabla es menor al χ^2 de prueba, resultado que es corroborado con el valor de p el cual es menor a 0,05.

Centrando el análisis en la población que se automedica (521) se realizaron una serie de preguntas con el ánimo de identificar la frecuencia, y las razones más relevantes por las cuales los individuos encuestados tomaban medicamentos sin prescripción médica (ver tabla 2). El ítem: *Indique los medicamentos con los que se automedica y al frente la enfermedad o condición por la cual ha consumido dicho medicamento* se analizó de manera separada debido al gran número de respuestas diferentes.

Así, las razones más relevantes reportadas por las que el individuo se automedica es la falta de tiempo para asistir al médico (24,4%) seguido de tener experiencia con el tipo de dolencia (16,3%) lo que puede indicar la existencia de una patología recurrente o crónica que debería ser tratada. Otras razones incluyen ahorro de dinero en el costo de la consulta (11,1%), la urgencia de tratar el malestar (10,0) y ver su patología como algo de poca importancia (10,9%) lo que evidencia una tendencia de automedicación no responsable, debido posiblemente a la falta de información sobre las consecuencias negativas de esta práctica.

Tabla 1. Variables sociodemográficas y condiciones académicas de los estudiantes encuestados.

Variable	Total (n=600) n (%)	N° NA (n=79) n (%)	N° A (n=521) n (%)	P	X ²	
					X ² <i>Tabla</i>	X ² <i>Prueba</i>
Masculino	318 (53,0)	50 (63,3)	268 (51,4)	0,1064	10,596	4,481
Femenino	282 (47,0)	29 (36,7)	253 (48,6)			
Programa académico						
Derecho	240(40,0)	8 (10,1)	232 (44,5)	0,000	12,6	111.3
Ing. Industrial	172 (28,7)	32 (40,5)	140 (26,9)			
Ing. Civil	50 (8,3)	5 (6,3)	45 (8,6)			
Psicología	56 (9,3)	0 (0)	56 (10,7)			
Administración de empresas	11 (1,8)	0 (0)	11 (2,1)			
Ing. Sistemas	45 (7,5)	23 (29,1)	22 (4,2)			
Contaduría	26 (4,3)	11 (13,9)	15 (2,9)			
NR	25(4,2)	5(6,3)	20(3,8)	0,137	22,362	13,618
16-17	12(2,0)	1(1,3)	11(2,1)			
18-19	151(25,2)	24(30,4)	127(24,4)			
20-21	174(29,0)	26(32,9)	148(28,4)			
22-23	90(15,0)	11(13,9)	79(15,2)			
24-25	62(10,3)	2(2,5)	60(11,5)			
26-42	86(14,3)	10(12,7)	76(14,6)			
Semestre						
1	62(10,3)	16(20,3)	46(8,8)	0,0008	16,919	28,515
2	76(12,7)	17(21,5)	59(11,3)			
3	92(15,3)	14(17,7)	71(13,0)			
4	74(12,3)	3(3,8)	78(15,0)			
5	60(10,0)	8(10,1)	52(10,0)			
6	44(7,3)	5(6,3)	39(7,5)			
7	49(8,2)	1(1,3)	48(9,2)			
8	41(6,8)	7(8,9)	34(6,5)			
9	52(8,7)	4(5,1)	48(9,2)			
10	50(8,3)	4(5,1)	46(8,8)			

(Continúa)

Tabla 1. Variables sociodemográficas y condiciones académicas de los estudiantes encuestados (*continuación*).

Variable	Total (n=600) n (%)	N° NA (n=79) n (%)	N° A (n=521) n (%)	p	X ²	
					X ² _{Tabla}	X ² _{Prueba}
1	42 (7,0)	10(1,3)	32(6,1)	0,003	11,071	17,937
2	305(50,8)	53(67,1)	252(48,4)			
3	198(33,0)	18(22,8)	180(34,5)			
4	52(8,7)	7(8,9)	45(8,6)			
5	10(1,7)	0(0,0)	10(1,9)			
6	2(0,3)	0(0,0)	2(0,4)			

Sí bien la automedicación se está convirtiendo en una práctica cada vez más importante dentro del cuidado de la salud, dirigiendo a los pacientes hacia una mayor independencia en la toma de decisiones sobre el tratamiento de enfermedades menores, empoderando al individuo, claramente en este caso particular estas no son las razones y si lo es una clara necesidad de urgencia por buscar alternativas que solucionen sus problemas de salud a la mayor brevedad.

Por tanto, en este caso, la automedicación está asociada con riesgos tales como diagnósticos erróneos, uso excesivo de dosis de medicamentos, duración prolongada del uso, interacciones medicamentosas y polifarmacia, condiciones que están muy alejadas de presentar ventajas para los sistemas de salud, al facilitar un mejor uso de las habilidades clínicas, aumentar el acceso a los medicamentos y propender a reducir los costos de medicamentos recetados, asociados con los programas de salud financiados por el estado.

Lo anterior puede ser sustentado, en el hecho, que, si bien el individuo no asiste a la consulta médica, más del 60% de los encuestados dicen consultar un profesional o persona de la salud diferente al médico o personas relacionadas con la venta de medicamentos como los empleados de droguerías. Sin embargo, es importante recalcar que, en Colombia, de acuerdo con el Decreto 2200 de 2005 el encargado de dispensar el medicamento no puede recomendar al usuario el uso de un medicamento en particular [8].

Un factor relevante de la encuesta, es que muestra la influencia de los medios publicitarios en la decisión final de consumo del tipo de medicamento, a las preguntas: en la mayoría de los casos, ¿quién ha sido indicado el uso del medicamento? Y, ¿es importante para usted el laboratorio que produce el medicamento?, para la primera pregunta la publicidad influye en el 6,5 %, y para la segunda, aproximadamente el 70 % de los

encuestados son influenciados por la publicidad de las diferentes empresas productoras y comercializadoras de medicamentos.

Un aliciente frente a la alta prevalencia de automedicación es que el 63% de las personas que se automedican, al persistir sus síntomas, acuden a consulta médica, sin embargo un 14,5 % de los encuestados dicen aumentar la dosis, lo que en términos de consumo de antibióticos podría generar la aparición o propagación de farmacoresistencia lo que de acuerdo con la OMS se ha transformado en una amenaza creciente para la salud pública y la provisión de asistencia sanitaria, esto ocurre posiblemente porque los estudiantes tienen conocimientos inadecuados, creencias poco precisas lo que conlleva a estas prácticas inadecuadas [9, 10], y en casos más puntuales la dosis puede superar la concentración tóxica mínima generando problemas de salud aún mayores. Lo anterior es reforzado frente a que el 72, 5% de los encuestados consumen el medicamento hasta cuando los síntomas de la patología desaparecen, lo que podría poner en alto riesgo la salud del individuo debido a posibles efectos adversos del medicamento administrado.

Finalmente, si bien el 84, 7% de los encuestados entienden que automedicarse pone en riesgo su salud, más del 70 % de las personas encuestadas practican una automedicación no responsable puesto que no tienen en cuenta factores tan importantes como la dosis, las posibles interacciones medicamentosas ni los efectos adversos de los medicamentos con los que se automedican, este fenómeno que al parecer se presenta en otros países como China en donde los estudiantes reportan resultados muy similares [11]. Si bien los encuestados aducen tener conocimiento de los riesgos asumidos al automedicarse, en realidad carecen de la información suficiente frente a los efectos nocivos a los cuales pueden estar expuestos al consumir medicamentos sin prescripción médica [12-13].

En cuanto al ítem: *Indique los medicamentos con los que se automedica y al frente la enfermedad o condición por la cual ha consumido dicho medicamento*, las categorías terapéuticas con las que la población estudiada se automedica más frecuentemente con el ánimo de tratar su patología (ver tabla 3) son analgésicos/antiinflamatorios (67%) dentro del cual el acetaminofén es el más consumido (44% de la población total), antigripales (16%) y antibióticos (5%). Se reporta además el consumo de antidepresivos (1%), antihipertensivos (1%), alcaloides como la cafeína (5%), fármacos para el tratamiento de la disfunción eréctil y la hipertensión (3%) y un restante (2%) entre midriáticos, anti-diarreicos, bloqueadores de la bomba de protones y relajantes del tono muscular. Un dato preocupante frente a los medicamentos reportados es que el 18% de los mismos requieren de receta médica los cuales en su mayoría son antibióticos [14] y analgésicos, resultados que concuerdan con estudios realizados en Jordania, donde un alto porcentaje de los estudiantes que se automedicaban lo hacían para el tratamiento de enfermedades bacterianas o tratamiento del dolor en distintas partes del cuerpo [15].

Tabla 2. Resultados obtenidos a través de la encuesta para las 14 preguntas que componen la encuesta.

Pregunta	Opciones de respuesta	n	%
¿Con qué frecuencia se automedica (toma de medicamentos sin el concepto de un médico)?	Nunca	79,0	13,2
	Sólo una vez	154,0	25,7
	Raramente (cada 4-12 meses)	151,0	25,2
	Ocasionalmente (cada 3-1 meses)	99,0	16,5
	Frecuentemente (más una vez al mes)	80,0	13,3
	Siempre (más de una vez a la semana)	37,0	6,2
Indique los medicamentos con los que se automedica y al frente la enfermedad o condición por la cual ha consumido dicho medicamento			
Señale la razón más importante por la cual Ud. se automedica (marque sólo una)	No tiene tiempo para ir al médico	127	24,4
	No cuenta con seguridad social	57	10,9
	Experiencia previa con el mismo tipo de dolencia	85	16,3
	Ahorrase el costo de la consulta	58	11,1
	Urgencia del problema o dolencia que no puede esperar a la consulta	52	10,0
	Encontró información relacionada con la enfermedad en Internet o algún medio masivo de comunicación	39	7,5
	El problema era demasiado trivial como para consultar a un médico	57	10,9
	Sabía todo lo que debía saber acerca de la enfermedad	35	6,7
	Curiosidad	9	1,7
En la mayoría de los casos, ¿por quién ha sido indicado el uso del medicamento?	Usted mismo	213	35,5
	Profesional de la salud no médico (enfermera, odontólogo)	251	41,8
	Empleado de la droguería	110	18,3
	Amigo	75	12,5
	Familiar	89	14,8

(Continúa)

Tabla 2. Resultados obtenidos a través de la encuesta para las 14 preguntas que componen la encuesta (*continuación*).

Pregunta	Opciones de respuesta	n	%	
En la mayoría de los casos, ¿por quién ha sido indicado el uso del medicamento?	Publicidad	39	6,5	
	Otro	3	0,5	
¿Es importante para usted el laboratorio que produce el medicamento?	Sí	398,0	66,3	
	No	123,0	20,5	
Al adquirir el medicamento en la droguería, ¿el empleado ofrece información sobre el producto?	Sí	434,0	72,3	
	No	87,0	14,5	
Sí luego de aumedicarse persisten los síntomas de la enfermedad, ¿cómo actúa?	Consulta un médico	378,0	63,0	
	Aumenta la dosis	87,0	14,5	
	Cambia de medicamento	48,0	8,0	
	Otro	8,0	1,3	
	No responde	0,0	0,0	
En qué momento deja de consumir el medicamento (automedicado)	Cuando desaparecen los síntomas	435,0	72,5	
	Cuando lo indica el prospecto	85,0	14,2	
	Otro (cuál)	0,0	0,0	
	No responde	1,0	0,2	
¿Lee usted y sigue la información consignada en la etiqueta del medicamento acerca del uso adecuado del mismo?	Siempre	154,0	25,7	
	Algunas veces	298,0	49,7	
	Nunca	69,0	11,5	
¿Recomienda el consumo de medicamentos que le han resultado efectivos?	Sí	476,0	79,3	
	No	45,0	7,5	
Al consumir un medicamento, ¿tiene en cuenta lo siguiente?	Dosis	Sí	318,0	53,0
		No	203,0	33,8
	Interacciones medicamentosas	Sí	89,0	14,8
		No	432,0	72,0
	Efectos adversos	Sí	105,0	17,5
		No	416,0	69,3
¿Sabe usted que pueden existir riesgos para su salud si se automedica?	Sí	508,0	84,7	
	No	13,0	2,2	

Tabla 3. Patologías tratadas mediante la práctica de automedicación por la población encuestada (resultados a partir del ítem: *Indique los medicamentos con los que se automedica y al frente la enfermedad o condición por la cual ha consumido dicho medicamento*).

Condición	% de automedicación	Condición	% de automedicación
Cefalea	38,6	Fiebre	1,7
Dolor	16,7	Gastralgia	1,7
Gripe	10,0	Veisalgia	1,7
Dismenorrea	4,7	Inflamación	1,1
Anticonceptivo	4,5	Mejorar potencia sexual	0,9
Gastritis	3,2	Espamo Muscular	0,9
Infecciones	2,7	Insomnio, estrés	0,8
Gastralgia	2,5	Asma	0,6
Hipersomnia	2,5	Malestar general	0,4
Diarrea	2,3	Hipertensión	0,4
Faringoamigdalitis	1,9	Chikungunya	0,2

Al realizar un análisis de antecedentes patológicos y conductas que ponen en riesgo la salud del individuo (ver tabla 4) se utilizó la medida de asociación OR. Las variables que mostraron asociación estadísticamente significativa con la conducta de automedicarse fue el consumo de bebidas energizantes con bebidas alcohólicas, el consumo de bebidas energizantes con medicamentos, padecer enfermedades como la migraña, artritis reumatoide, alergias y en mujeres los cólicos menstruales (dismenorrea).

Los resultados del estudio demuestran que la automedicación es una problemática global, al comparar el estudio con otros realizados en ambientes universitarios se encuentran similitudes como los porcentajes de prevalencia, muestra de ello está el trabajo académico en Universidad de La Plata (Argentina) el cual reportó una prevalencia del 95% [4], en la Universidad del Rosario (Colombia) 79,3% [16], Universidad de Antioquía (Colombia) 97% [17], Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (Colombia) 73%[18], Universidad Nacional del Nordeste (Argentina) 85% [7], Santhiram Medical College (India) 90% [19], Universidad de Karachi (Pakistán) 76%[20], Universidad de Gondar (Etiopía) 53,7%[21], Universidad de Ljubljana (Slovenia) 92,3 [22].

Tabla 4. Resultados de las preguntas análisis de antecedentes patológicos y conductas.

Pregunta	Respuestas afirmativas (n=600)	OR	Intervalo de confianza 95 %		P
En los últimos 12 meses, ¿ha consultado, por cualquier razón, algún profesional de la salud (médico, enfermera, odontólogo u otro)?	420 (70)	1,612	0,988	2,632	0,056
¿Ha fumado por lo menos 100 cigarrillos en toda su vida?	178 (30)	1,191	0,699	2,030	0,520
¿Actualmente fuma?	130 (22)	1,103	0,613	1,983	0,744
¿Consume bebidas energizantes?	236 (39)	1,004	0,619	1,631	0,986
¿Ha consumido bebidas energizantes junto con bebidas alcohólicas?	148 (25)	1,972	1,035	3,758	0,039
¿Ha consumido bebidas energizantes junto con medicamentos?	84 (14)	7,191	1,732	29,855	0,007
¿Ha consumido bebidas alcohólicas junto con medicamentos?	90 (15)	1,432	0,688	2,981	0,337
¿Alguna vez un profesional de la salud le ha dicho que ha tenido o que tiene la tensión arterial alta?	81 (14)	0,959	0,484	1,903	0,906
¿Está actualmente en tratamiento con medicamentos para controlar la tensión arterial?	67 (11)	1,133	0,520	2,471	0,753
¿Alguna vez un profesional de la salud le ha dicho que pesa más de lo que debiera?	102 (17)	1,690	0,815	3,505	0,159
¿Alguna vez un médico le ha dicho que tiene el colesterol alto en la sangre?	70 (12)	1,704	0,712	4,077	0,231
¿Está llevando a cabo actualmente algún programa o tratamiento para mantener controlado su colesterol?	45 (8)	7,195	0,977	52,981	0,053
¿Alguna vez un profesional de salud le ha dicho que tiene diabetes o azúcar alta en la sangre?	71 (12)	0,636	0,331	1,224	0,175
¿Está llevando a cabo actualmente algún programa o tratamiento para mantener controlada la diabetes o azúcar en la sangre?	43 (7)	2,107	0,636	6,980	0,223
¿Consume con frecuencia bebidas alcohólicas?	208 (35)	1,169	0,704	1,942	0,545
¿Ha sentido la necesidad de disminuir o dejar de tomar bebidas alcohólicas?	155 (26)	0,888	0,523	1,509	0,661
¿Le han criticado la frecuencia o cantidad en qué consume bebidas alcohólicas?	132 (22)	1,503	0,801	2,819	0,204

(Continúa)

Tabla 4. Resultados de las preguntas análisis de antecedentes patológicos y conductas (*continuación*).

Pregunta		Respuestas afirmativas (n=600)	OR	Intervalo de confianza 95 %		P
¿Se ha sentido culpable por la forma que bebe?		89 (15)	1,411	0,677	2,939	0,358
¿Ha tenido que tomarse un trago a primera hora de la mañana para aliviar la resaca (guayabo) del día anterior?		81 (14)	0,959	0,484	1,903	0,906
¿Ha usado medicamentos u otras sustancias con fines “recreativos”?		45 (8)	0,984	0,403	2,407	0,973
¿Ha padecido o padece alguna de las siguientes enfermedades?	Insuficiencia renal aguda o crónica	26 (4)	1,859	0,431	8,024	0,406
	Cáncer, leucemia, linfoma o mieloma	23 (4)	1,617	0,372	7,034	0,522
	Enfermedades vasculares y del corazón tales como aneurismas, arritmia, angina de pecho, infarto, soplos cardíacos o enfermedades de las válvulas cardíacas	25 (4)	8,166	0,492	135,490	0,143
	Enfermedades del sistema nervioso, epilepsia o convulsiones	27 (5)	1,941	0,451	8,357	0,374
	Mentales o psiquiátricas	26 (4)	1,170	0,343	3,991	0,802
	Enfermedades respiratorias crónicas como asma	58 (10)	2,168	0,763	6,162	0,147
	Migraña	140 (23)	5,176	2,049	13,075	0,001
	Acné	107 (18)	0,915	0,499	1,677	0,774
	Síndrome del colon o intestino irritable	41 (7)	0,600	0,267	1,351	0,218
	Lupus	20 (3)	1,378	0,313	6,055	0,671
	Artritis reumatoide	29 (5)	2,473	1,105	5,537	0,028
	Alergias	108 (18)	2,486	1,163	5,315	0,019
	Pregunta sólo para mujeres: cólicos menstruales	122 (20)	3,390	1,592	7,218	0,002
¿Le han realizado alguna vez diálisis renal?		21 (4)	6,830	0,410	113,889	0,181
¿Consume o le han formulado alguno de estos medicamentos?	Antirretrovirales (indinavir, zidovudina, zalcitabina u otros)	21 (4)	6,830	0,410	113,889	0,181
	Quimioterapia o radioterapia	17 (3)	1,141	0,256	5,088	0,862

(Continúa)

Tabla 4. Resultados de las preguntas análisis de antecedentes patológicos y conductas (*continuación*).

Pregunta		Respuestas afirmativas (n=600)	OR	Intervalo de confianza 95 %		P
¿Consume o le han formulado alguno de estos medicamentos?	Medicamentos para la hemofilia (Factor VIII o IX)	0 (0)	0,152	0,003	7,738	0,348
	Otra situación (cual)	0 (0)	0,152	0,003	7,738	0,348

Una preocupación relevante reportada por algunos autores es la problemática por el consumo indiscriminados de antibióticos debido al desarrollo de resistencia por parte de cepas patógenas [23], algunas de las razones reportadas por otros estudios concuerdan con las presentadas en este estudio tales como: falta de tiempo para asistir al médico, no contar los recursos económicos para el pago de citas médicas, experiencia previa con el medicamento consumido [24]. Además el guardar los medicamentos recetados por el médico, que no fueron consumidos por el paciente, promueve la automedicación debido a que además de ser sugerido por la persona que consumió el medicamento, el tener el medicamento a la mano conduce al individuo que padece una afección similar a consumir dicho medicamento [25], finalmente tanto los resultados de este estudio como los reportados por Peng y colaboradores [26] sugieren que el consumo de antibióticos no está relacionado con el desarrollo de la región o niveles socioeconómicos. Poner al descubierto que los antibióticos reportados en el estudio no son de venta libre (amoxicilina, ampicilina, metronidazol, penicilina, cefalexina y eritromicina) evidencia el riesgo latente de la automedicación.

Ahora bien, se espera que los farmacéuticos participen en el proceso de la prescripción de medicamentos, sin embargo, estos pueden estar influyendo en la venta de medicamentos de venta bajo prescripción médica, por lo que la práctica de automedicación no responsable es un fenómeno en auge que aumenta día tras día.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio revelaron que la prevalencia de la automedicación no responsable en la comunidad universitaria es relativamente alta, lo cual puede conducir a efectos adversos, generar interacciones medicamentosas o con otras sustancias (p. ej. alimentos, productos naturales), inducir conductas de abuso o dependencia e incluso aplazar el diagnóstico de una afección que debiera requerir atención médica. Por ende, consideramos que se deben enfatizar las medidas regulatorias para la disminución de esta práctica. Por otra parte, se debe estimular el desarrollo de directrices nacionales

basadas en la evidencia que guíen de manera efectiva y segura el uso y los patrones de prescripción de los medicamentos. Finalmente, se deben llevar a cabo campañas de concienciación sobre la salud y la automedicación para prevenir el uso indebido de medicamentos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. World Health Organization, “WHO guidelines for the regulatory assessment of medicinal products for use in self-medication”, Ed. Por World Health Organization (WHO), Geneva, 2000.
2. D. Bennadi, Self-medication: A current challenge, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, **5**(1), 19-23 (2013).
3. M. Ruiz, Risks of Self-Medication Practices, *Current Drug Safety*, **5**(4), 315-323 (2010).
4. C. Hughes, J. McElnay & G. Fleming, Benefits and risks of self medication, *Drug Safety*, **24**(14), 1027-1037 (2001).
5. D. Bennadi, Self-medication: A current challenge, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, **5**(1), 19-23 (2014).
6. C. Castronuovo, F. Chiclana, L. Giosso, G. Pensa, M. Prario, V. Rebollo, N. Bustos, A. Talevi, S. Muñoz, Automedicación en estudiantes de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina), *Latin American Journal of Pharmacy*, **26**(6), 937-44 (2007).
7. M. Aguado, B. María, L. Santos Antola, B. Carlos, Automedicación en estudiantes de Farmacia de la Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **24**(2), 271-276 (2015).
8. Ministerio de protección Social, Decreto numero 2200 de 2005.
9. A.F. Sawalha, A descriptive study of self-medication practices among Palestinian medical and nonmedical university students, *Research in Social and Administrative Pharmacy*, **4**(2), 164-172 (2008).

10. C. Buke, M. Hosgor-Limoncu, S. Ermertcan, M. Ciceklioglu, M. Tuncel, T. Köse, S. Eren, Irrational use of antibiotics among university students, *Journal of Infection*, **51**(2), 135-139 (2005).
11. X. Wang, D. Peng, W. Wang, Y. Xu, X. Zhou, T. Hesketh, Massive misuse of antibiotics by university students in all regions of China: implications for national policy, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **50**(3), 441-446 (2017).
12. A. Sharma, S. Oommen, I. Topno, R.P. Saya, Perceptions and practices of self-medication in healthcare and nonhealthcare university students in South India, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, **26**(6), 633-640 (2015).
13. B. Lv B, Z. Zhou, G. Xu, D. Yang, L. Wu, Q. Shen, M. Jiang, X. Wang, G. Zhao, S. Yang, Y. Fang. Knowledge, attitudes and practices concerning self-medication with antibiotics among university students in western China, *Tropical Medicine and International Health*, **19**(7), 769-779 (2014).
14. INVIMA, Listado de medicamentos de venta libre OTC actualizado a junio de 2018, <https://www.invima.gov.co/vuce/239-salas-especializadas/sala-especializada-de-medicamentos-y-productos-bio/3504-listado-de-medicamentos-de-venta-libre-otc.html>, octubre de 2018.
15. O.Y. Alshogran, K.H. Alzoubi, O.F. Khabour, S. Farah, Patterns of self-medication among medical and nonmedical University students in Jordan, *Risk Management and Healthcare Policy*, **11**, 169-176 (2018).
16. C.A. López-Cabra, J.M. Gálvez-Bermúdez, C. Domínguez-Domínguez, A.P. Urbina-Bonilla, C.A. Calderón-Ospina, Automedicación en estudiantes colombianos de pregrado de medicina de la Universidad del Rosario en Bogotá D. C., Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(3), 374-384 (2016).
17. F.A. Tobon-Marulanda, Estudio sobre automedicación en la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, *Revista Médica Universidad de Antioquia*, **15**(4), 242-247 (2002).
18. K.J. Bravo, D.E. Espinel, P.A. Pardo, J.A. Robles, “Automedicación en estudiantes de medicina de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) en el segundo semestre de 2017”, Tesis de Grado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2017, pp. 1-79.

19. M. Venkateswarlu, M.A. Mushtaq Pasha, I. Ebenezer, A. Fatima, A study of self medication patterns among medical students in Santhiram Medical College, Nandyal, *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, **3**(59), 13275-13281 (2014).
20. S. Zafar, R. Syed, S. Waqar, A. Zubairi, T. Vaqar, M. Shaikh, W. Yousaf, S. Shahid, S. Saleem, Self-medication amongst university students of Karachi: prevalence, knowledge and attitudes, *Journal of the Pakistan Medical Association*, **58**(4), 214-217 (2008).
21. S.M. Abay, W. Amelo, Assessment of Self-Medication Practices Among Medical, Pharmacy, and Health Science Students in Gondar University, Ethiopia, *Journal of Young Pharmacists*, **2**(3), 306-310 (2010).
22. Z. Klemenc Ketis, Z. Hladnik, J. Kersnik, Self-medication among healthcare and non-healthcare students at University of Ljubljana, Slovenia, *Medical Principles and Practice*, **19**, 395-401 (2010).
23. A. Sultan, A. Khalid, B. Salmeen, A. Abdullah, N.A. Mohammed, Self-medication with antibiotics in Saudi Arabia, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **26**(5), 719-724 (2018).
24. K.A. Al-Kubaisi, M. De Ste Croix, D. Vinson, L. Ellis, S.I. Shari, A.R. Abduelkarem, What drives using antibiotic without prescriptions? A qualitative interview study of university students in United Arab Emirates, *Pharmacy Practice (Granada)*, **16**(2), 1172-1179 (2018).
25. X. Wang, L. Lin, Z. Xuan, L. Li, X. Zhou, Keeping Antibiotics at Home Promotes Self-Medication with Antibiotics among Chinese University Students, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **15**(4), 687-700 (2018).
26. D. Peng, X. Wang, Y. Xu, C. Sun, X. Zhou, Antibiotic misuse among university students in developed and less developed regions of China: a cross-sectional survey, *Journal Global Health Action*, **11**(1), 1-11 (2018).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.P. Ortiz, O.D. Fúnez-David, H. Rubiano-Daza, C.L. García-Rojas, C.A. Calderón-Ospina, D.R. Delgado, Automedicación en estudiantes de la Sede Neiva de la Universidad Cooperativa de Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 128-144 (2019).

CdCl₂ has zero-order kinetic cellular influx and induces cytotoxicity and genotoxicity at low concentrations in human leukocytes *in vitro*

Vanessa Fontoura dos Santos¹, Elvio Adílio Serpa¹, Fabiana Ernestina Barcellos da Silva¹,
Érico Marlon de Moraes Flores², Michel Mansur Machado¹, Luís Flávio Souza de Oliveira^{1*}

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA),
Uruguaiana, BR 472 Km 592, Caixa Postal 118, CEP 97500-970, Brazil.

*E-mail: tcheluisoliveira@gmail.com

²Chemistry Department, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Av. Roraima,
1000-Camobi, Santa Maria - RS, CEP 97105-900, Brazil.

Received: October, 2018

Accepted: February 19, 2019

SUMMARY

Cadmium (Cd²⁺) is a nonessential heavy metal that possesses a high capacity of bioaccumulation and exhibits toxic characteristics even at low concentrations. This study evaluated the genotoxicity and cytotoxicity in human leukocytes *in vitro* after exposure to a lower range of Cd²⁺ concentration (1-25 µg/mL) using an unprecedented strategy by correlating between intracellular Cd²⁺ levels after exposure and cellular damage. Results demonstrated that Cd²⁺ exposure from 5 to 25 µg/mL significantly increased the unviability of leukocytes, as well as the DNA damage, which was dose-dependent. The intracellular Cd²⁺ levels in leukocytes ranged from 9.85 to 94.38 pg/cell, and cytotoxicity and genotoxicity were induced at a concentration of 24.22 pg/cell. The relationship between exposure concentration and intracellular Cd²⁺ levels suggests that its influx occurs in human leukocytes under zero-order kinetics.

Keywords: Cadmium, cellular damage, DNA damage, defense cells.

RESUMEN

El CdCl₂ tiene un influjo celular cinético de orden cero e induce citotoxicidad y genotoxicidad a bajas concentraciones en leucocitos humanos *in vitro*

El cadmio (Cd²⁺) es un metal pesado no esencial que posee una alta capacidad de bioacumulación y presenta características tóxicas incluso en bajas concentraciones. Este estudio evaluó la genotoxicidad y la citotoxicidad en leucocitos humanos *in vitro* después de la exposición a un rango inferior de concentración de Cd²⁺ (1-25 µg / mL) mediante una estrategia sin precedentes al correlacionar los niveles intracelulares de Cd²⁺ después de la exposición y el daño celular. Los resultados demostraron que la exposición a Cd²⁺ de 5 a 25 µg/mL aumentó significativamente la inviabilidad de los leucocitos, así como el daño en el ADN, que era dependiente de la dosis. Los niveles intracelulares de Cd²⁺ en leucocitos oscilaron entre 9,85 y 94,38 pg/célula, y se indujo la citotoxicidad y la genotoxicidad a una concentración de 24,22 pg/célula. La relación entre la concentración de la exposición y los niveles intracelulares de Cd²⁺ sugiere que su influjo se produce en leucocitos humanos bajo una cinética de orden cero.

Palabras clave: Cadmio, daño celular, daño en el ADN, células de defensa.

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a heavy metal belonging to class II-B of the periodic table [1] that, even at low concentrations, has toxic effects [2, 3]. In addition, Cd is a widely distributed pollutant in several sources as industrial waste, plastics and odontologic materials [2], cigarette smoke [4], forest fires [3], pigments [5], and fertilizers [6] and thus causes food and water contamination [7, 8].

Cd²⁺ bioaccumulates primarily in the liver, kidneys, bones, and pancreas [9, 10], which ultimately results in hepatic and renal dysfunctions, as well as osteoporosis and pancreatic cancer [11].

The mechanism by which Cd²⁺ induces cellular injuries appears to be supported, at least in part, by apoptotic pathways [3, 12]. Furthermore, the potential injury caused by Cd²⁺ appears to be associated with our own ability to induce protein denaturation and oxidative stress and decrease the enzymatic activity [13-15].

However, only a few studies have evaluated the genotoxicity in human cells exposed to lower concentrations of Cd. Herein, we report the *in vitro* minimal Cd²⁺ concentrations that could cause genotoxicity and cytotoxicity in human leukocytes. These screening experiments were performed at concentrations ranging from 1 to 25 µg/mL, which are significantly lower than those cited in the literature. We also determined the intracellular Cd²⁺ levels after cellular exposure to understand the relationship with the observed cell damage and also to elucidate the kinetic entrance of Cd²⁺ into human leukocytes under experimentally controlled conditions.

MATERIALS AND METHODS

Ethical aspects

The experimental protocols performed in this study, including the collection of venous blood samples, were submitted to and approved by the Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brazil) Research Ethics Committee under the registration number 0089.0.243.000-07.

Material preparation

The study material was prepared as previously described [16]. Briefly, the material that was used for *in vitro* assays was new and disposable to avoid Cd²⁺ contamination. Control samples of the reagents were tested to identify metal contamination. Before use, all glassware was immersed in 20% aqueous HNO₃ (v/v) for 24 h and subsequently rinsed with deionized water.

Both the comet and cell viability assays were performed in triplicate, while six replicates were analyzed to quantify the intracellular Cd²⁺ content. The following screening strategy was performed for all assays: (1) negative control–adjusted leukocyte suspension (LS) (10⁴ cells/mm³) in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4); (2) positive control–LS plus 4 mM H₂O₂; tests–composed of LS with either 1, 2.5, 5, 10, 15, or 25 µg/mL Cd²⁺ (CdCl₂ analytical grade, Merck®, Darmstadt, Germany). This concentration range was chosen based on specialized literature data that related the metal concentration with cellular or DNA damage [17–19]. All sample groups were incubated for 1 h at room temperature (25°C) under slow stirring of which the direction was inverted every 10 min. Thereafter, the abovementioned tests were performed, as described below, with the exception of the intracellular Cd²⁺ quantification. In this case, the samples were additionally washed five times with PBS (pH 7.4) and centrifuged at 2000 rpm for 10 min at room temperature.

Intracellular Cd²⁺ Content (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-ICP-MS)

The intracellular Cd²⁺ concentration in the leukocytes was quantified using ICP-MS analysis. The samples were adequately diluted in 5% HNO₃ (v/v) by the factor required to obtain within the concentration range of the calibration curve and analyzed by ICP-MS (PerkinElmer SCIEX, Model Elan DRC II, Thornhill, Canada) to determine the extracted Cd content. A certified reference material was used for the measurements, which resulted in consistent concentrations (98%–101%). Special care was taken concerning the material and the treatment of the samples (human leukocytes).

The water used was previously distilled and deionized in an ion-exchange column and purified using a Milli-Q system (Millipore[®], Billerica, USA) with a resistivity of 18.2 MΩ/cm. The reagent used for the decomposition of LS (HNO₃, 65%, 1.4 kg/L, Merck[®], Darmstadt, Germany) was of redistilled analytical grade (model duoPUR distillation Subboiling Distillation System, Milestone[®], Sorisole, Italy).

Argon (99.999 % purity, White Martins, Brazil) was used for plasma generation. Hydrochloric acid solution was prepared by diluting the concentrated acid in water. Sodium tetrahydroborate (NaBH₄, PA, minimum purity of 97%, Nuclear[®], Brazil) solution was prepared by dissolving the solid reagent in a 0.1% (w/v) NaOH solution (minimum purity of 99%, Vetec[®], Brazil). Cd²⁺ was added from a stock solution of CdCl₂ (1000 mg/L). All materials were decontaminated through immersion in an aqueous HNO₃ 20% (v/v) solution for 24 h and subsequently rinsed with distilled/deionized water.

The leukocyte decomposition was done by the wet method in an open system (block digester-Tecnal, model TE 040/25 for 40 quartz tubes, aluminum body, and thermostat). The samples were weighed and transferred to glass tubes (2.5 × 40 cm), followed by addition of 4 mL of concentrated HNO₃ and 1 mL of 1 N HCl. The temperature was increased to 50 °C for 20 min and 90°C for 4 h and 30 min. Glass funnels were placed on the upper end of the pipes for the efficiency of the digestion procedure. After cooling to room temperature, the solutions were transferred to graduated polypropylene vials, and the volume was adjusted to 25 mL using ultra-purified water. The samples were adequately diluted in 5% HNO₃ (v/v) by the factor required to obtain within the concentration range of the calibration curve and analyzed by ICP-MS.

The intracellular Cd²⁺ content was calculated, considering the number of 10⁴ cells/mm³ from LS, taking into account the Cd²⁺ concentration to which the cells were exposed and the value determined by the ICP-MS analysis for the same, which was assumed as the content of Cd²⁺ taken up by cells. The data obtained from the replicates were taken into account to generate the data of their respective groups.

Cytotoxicity assessment

The cytotoxicity of Cd²⁺ was evaluated by a cell viability test using the trypan blue method to determine the loss of membrane integrity [20]. Initially, the cells were exposed to the previously established Cd²⁺ concentration. After the incubation, 100 µL of LS was mixed for 8 min with 100 µL of 0.4% trypan blue solution. The cell viability was determined microscopically (400 × magnification) in a Neubauer chamber, and the following two categories of cells were scored: (1) living cells that appeared uncolored or light blue and (2) dead cells with a blue color. For this assay, 300 cells were counted for each sample analyzed.

Genotoxicity assessment

The alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis assay) was performed to evaluate genotoxicity according to a previously described methodology [16] and in accordance with the comet assay guidelines [21]. The microscope slide analysis was performed, counting 100 cells per slide and classifying them based on damage levels from 0 (no damage) to 4 (maximum damage). The average obtained for each treatment allowed calculating the respective damage rate, considering the DNA damage scale from 0 (100 cells×0) to 4 (100 cells×4) as proposed earlier [22].

Statistical analysis

All data obtained from the tests carried out in this study were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test, wherever appropriate, considering $p < 0.05$ for statistical significance.

RESULTS

Evaluation of Intracellular Cd Content in Human Leukocytes

One of the challenges in studies on metal toxicology is to determine the quantity of the heavy metal that is capable of entering into the cytoplasm from the cell exposed to the metal. This issue is also applicable to Cd²⁺ and needs to be elucidated. Furthermore, it is crucial to understand if there is a constant cell entry percentage or if this entry is disproportional considering the different concentrations of exposure. Figure 1 shows an increasing intracellular Cd²⁺ concentration in human leukocytes exposed to CdCl₂ at concentrations ranging from 1 to 25 µg/mL, which occurred in a concentration-dependent manner ($p < 0.001$).

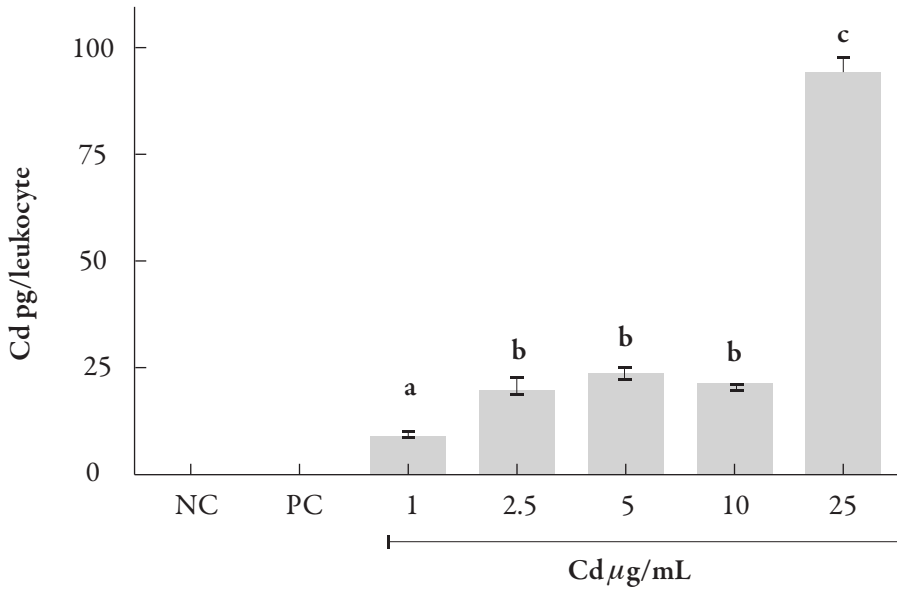


Figure 1. Intracellular Cd content in human leukocytes exposed to different concentrations of the metal. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons, and expressed as mean $\pm$ SEM, with $p < 0.01$. ^{a, b, c, d}. The superscript letters indicate statistical difference between groups; NC = negative control, PC = positive control.

The percentage of Cd cellular influx equivalent to a leukocyte related to the exposure to different CdCl₂ concentrations is shown in the figure 2, which allows evaluating the profile of Cd entry into a leukocyte. As shown in the figure, there is a decrease in the percentage of Cd cellular input, which occurs with a stabilization from 5 to 25 µg/mL. This phenomenon indicates a decay entry percentage but at the same time leads us to suggest that the influx kinetics is of zero-order.

Both Cd exposure and intracellular Cd concentrations were related to the percentage of cell unviability (Fig. 3) and DNA damage index (see figure 4) in human leukocytes to elucidate the Cd concentrations capable of inducing injury in these cells. Our results demonstrated that Cd exposure at concentrations ranging from 5 to 25 µg/mL significantly decreased the leukocyte cell viability compared with the negative control ($p < 0.001$), in particular at two higher concentrations, 10 and 25 µg/mL.

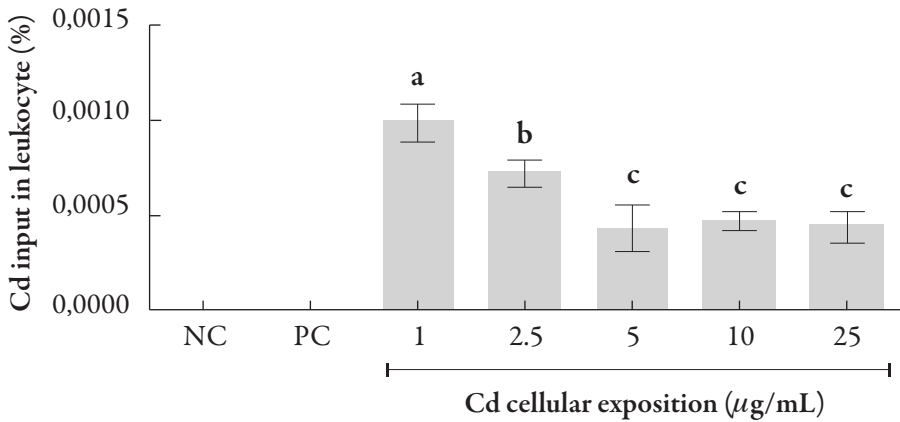


Figure 2. Percentage of cellular input of Cd in human leukocytes. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons, and expressed as mean $\pm$ SEM, with $p < 0.01$. ^{a, b, c} the superscript letters indicate statistical difference between groups; NC = negative control, PC = positive control.

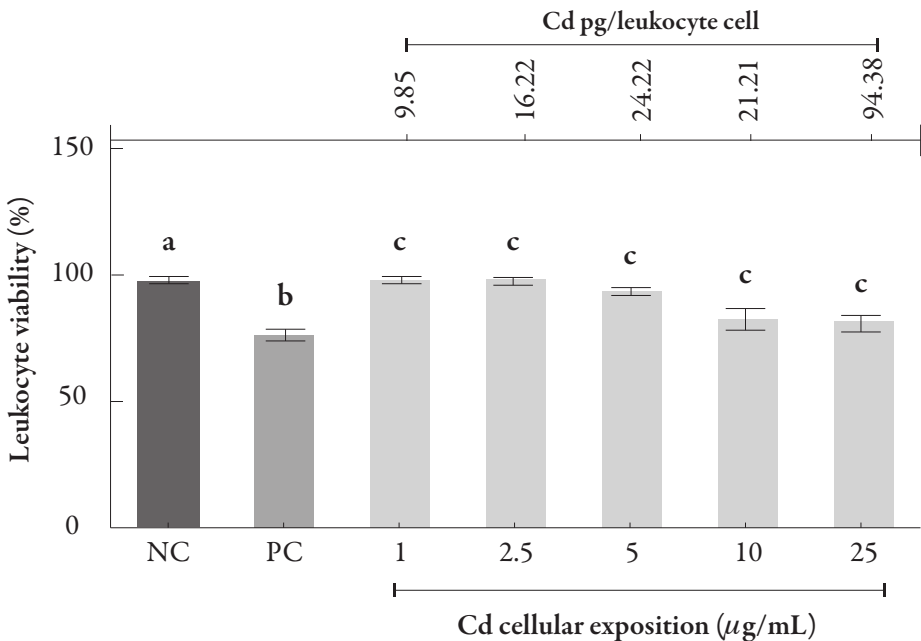


Figure 3. Percentage of cells in the cell viability assay in human leukocytes exposed to different CdCl₂ concentrations. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons, and expressed as mean $\pm$ SEM, with $p < 0.001$; ^{a, b, c}. The superscript letters indicate statistical difference between groups; NC = negative control, PC = positive control.

Figure 4 shows the DNA damage index of leukocytes after CdCl_2 exposure. The comet assay demonstrated that the exposure concentrations of 1 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$, where the intracellular Cd levels were 9.85 and 16.22 pg/cell , respectively, did not cause significant DNA damage, since the damage levels were similar to the damage levels found in the negative control (0.001). On the other hand, at the exposure concentration range from 5 to 25 $\mu\text{g/mL}$, which is equivalent to the intracellular Cd content from 21.21 to 94.38 pg/cell , we were able to observe higher DNA damage levels, although they were lower than those observed for the positive control ($p < 0.001$).

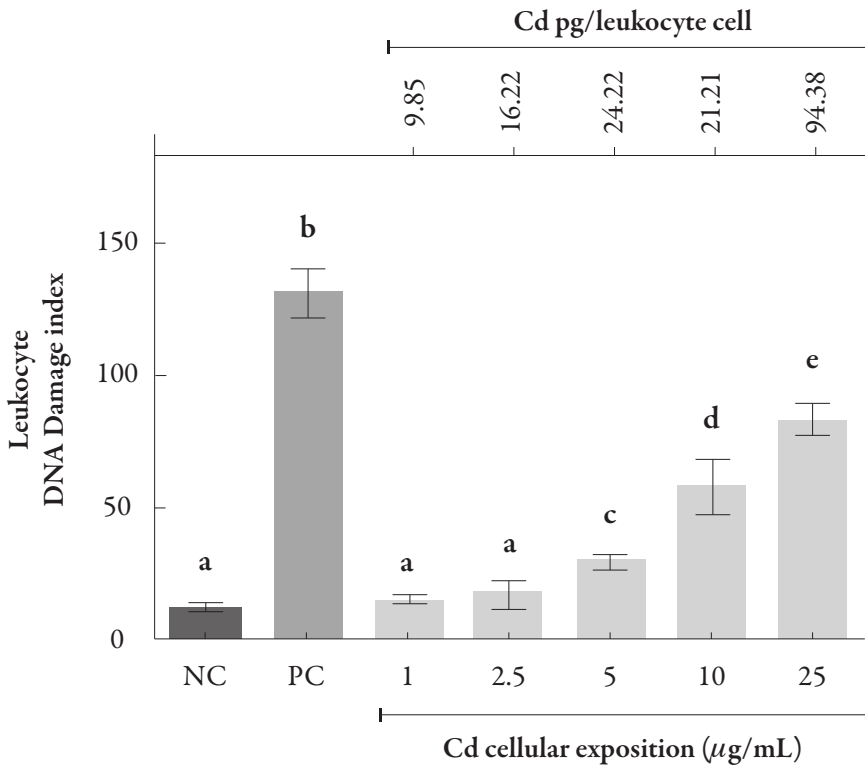


Figure 4. Rate of DNA damage in human leukocytes exposed to different CdCl_2 concentrations and its respective intracellular levels following exposure. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons, and expressed as mean $\pm$ SEM, with $p < 0.001$. a, b, c, d - the superscript letters indicate statistical difference between groups; NC = negative control, PC = positive control.

DISCUSSION

Cd²⁺ is a nonessential heavy metal and one of the most relevant toxic pollutants associated with environmental and public health, which is due to its high water solubility and bioaccumulation capacity in living organisms [23, 24]. Furthermore, Cd²⁺ is potentially carcinogenic and teratogenic, causing several abnormalities [24, 25]. Cd²⁺ also contributes to the genotoxicity of other agents that may cause damage to the DNA structure [25, 26].

The cellular unviability and comet assays are techniques that are capable of detecting damages to cells and DNA, respectively. The literature reports different data about Cd²⁺ pertaining to cellular and DNA damages at different concentrations [27-29]. However, in this study, we demonstrated, using an unprecedented strategy, that the cellular and DNA damages begin to appear at concentration from 5 µg/mL of CdCl₂ considering a short exposure of 1 h.

There are several studies demonstrating Cd²⁺ toxicodynamic mechanisms. These studies address different molecular targets such as the increase in oxidative stress, evidenced by the increase in catalase and superoxide dismutase activities, besides the increase in malondialdehyde levels and the depletion of GSH concentrations [30-32]. In addition, Cd²⁺ exposure increases the cytosolic calcium levels under homeostatic conditions, i.e., at 0.1 µM [34]. This event triggers cellular destruction through the activation of phospholipases, endonucleases, proteases, and Ca⁺²/Mg⁺² ATPases dependent on the energy associated to the membrane [33-35].

Consistent with this, some studies corroborate with the apoptotic mechanisms deflagrated after Cd²⁺ exposure of crab hepatopancreas (30-57 mg/mL) and cortical neurons of rats (20-25 µM for 24-48 h), where it was possible to observe an increase in the activity of caspases 9 and 3, but not caspase 8, associated with a decrease in cytochrome c activity and an increase in the expression of poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) [28, 29]. These data corroborate with the idea that cellular and DNA damages may be induced by free radicals after Cd²⁺ exposure, since cytochrome c is activated and released to activate caspase 9, especially through free radical generation. Notwithstanding, PARP is closely associated with cellular and DNA repair mechanisms, which is used as a biomarker for such.

In addition, human lungs cell strain (A549 and H441) were exposed to 20 and 40 µM of CdCl₂ that resulted in an increase in the activities of metallothionein (MT), HSP70, and MDR1. These data corroborate with the above-cited whether considered the mechanisms of auto defense triggered by cells under injuries against their

aggressors, as the Cd^{2+} . In this case, the cell attempts to neutralize Cd^{2+} by binding with MT; decrease the effects of stress oxidative through the HSP70, as well as to participate of protein folder; or increase the transport of metal efflux through the MDR1. However, these cytoprotective events are not effective when the metal concentrations are higher than their capacity to neutralize them [27].

The Cd^{2+} accesses the inside of the cells competing with the input pathways via ion channels, solutes carriers or ATP-requiring pumps. Once in the cell, Cd^{2+} can exert its toxic effects by binding to the thiol compounds scattered throughout the cell (cytosol and nucleus), as observed in the disruption respiratory chain function by binding Cd^{2+} to mitochondrial thiol proteins. In addition, Cd^{2+} may bind to the amino acid-cystine transporters (SLC79/SLC3A1 and SLC7A9/SLC7A13) to access the cytosol. Besides, it is accepted that Cd^{2+} has direct interaction with cellular DNA, is capable of inhibiting the nuclease of incision during DNA repair, as well as be able to exert an interference in the chromatin condensation [36].

Based on the abovementioned assumptions, the damage induced by Cd^{2+} in different types of cells is dependent on concentration and time of exposure. However, till date, no study has yet demonstrated the range of intracellular Cd^{2+} concentrations that could induce cellular damage. Although we are not aware of the fact whether intracellular Cd^{2+} concentration resulting from the exposure of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ has the same profile of cellular input, we can confirm that in human leukocytes, under the evaluated conditions, the Cd^{2+} content of 33 pg/leukocyte is responsible to induce cytotoxicity and genotoxicity. Furthermore, the intracellular Cd^{2+} percentages resulting from the exposure concentrations in leukocytes suggest a profile of zero-order kinetics, which may be associated with the saturation of a specific protein domain for the binding of metals in cell membranes.

CONCLUSION

Our results provide new insights regarding the concentration, exposure, and Cd^{2+} (CdCl_2) that are capable of inducing cell cytotoxicity and genotoxicity in human leukocytes. Furthermore, our study provides a better understanding about *in vitro* Cd^{2+} as a source of inducing cytotoxicity and genotoxicity at the exposure concentrations ranging from 5 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with the intracellular levels ranging from 21.21 to 94.38 pg/cell, respectively. Using an unprecedented strategy, the intracellular Cd^{2+} level was correlated with the different exposure concentrations, and based on this, we could deduce that the Cd inflow occurs under zero-order kinetics.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. X. Cao, H. Wang, D. Zhuang *et al.*, Roles of MSH2 and MSH6 in cadmium-induced G2/M checkpoint arrest in Arabidopsis roots, *Chemosphere*, **201**, 586-594 (2018).
2. J. Jean, V. Sirot, M. Hulin *et al.*, Dietary exposure to cadmium and health risk assessment in children. Results of the French infant total diet study, *Food Chem. Toxicol.*, **115**, 358-364 (2018).
3. A. Waseem, J. Arshad, A review of Human Biomonitoring studies of trace elements in Pakistan, *Chemosphere*, **163**, 153-176 (2016).
4. K. Ghosh, N. Indra, Cadmium treatment induces echinocytosis, DNA damage, inflammation, and apoptosis in cardiac tissue of albino Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **59**, 43-52 (2018).
5. M. Panjehpour, M.A. Taher, M. Bayesteh, The growth inhibitory effects of cadmium and copper on the MDA-MB468 human breast cancer cells, *J. Res. Med. Sci.*, **15**(5), 279 (2010).
6. D. Belhaj, K. Athmouni, M.B. Ahmed *et al.*, Polysaccharides from *Phormidium versicolor* (NCC466) protecting HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and rat liver tissues from cadmium toxicity: Evidence from in vitro and in vivo tests, *Int. J. Biol. Macromol.*, **113**, 813-820 (2018).
7. D. Li, P. Wang, C. Wang, X. Fan, X. Wang, B. Hu, Combined toxicity of organophosphate flame retardants and cadmium to *Corbicula fluminea* in aquatic sediments, *Environ. Pollut.*, **243**, 645-653 (2018).
8. G.K. Bielmyer-Fraser, B. Harper, C. Picariello, A. Albritton-Ford, The influence of salinity and water chemistry on acute toxicity of cadmium to two euryhaline fish species, *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, **214**, 23-27 (2018).
9. A. Jacquet, J. Arnaud, I. Hininger-Favier *et al.*, Impact of chronic and low cadmium exposure of rats: Sex specific disruption of glucose metabolism, *Chemosphere*, **207**, 764-773 (2018).

10. H. Chen, Y. Lu, Z. Cao *et al.*, Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells, *Toxicol. Lett.*, **246**, 7-16 (2016).
11. R. Fan, P.C. Hu, Y. Wang *et al.*, Betulinic acid protects mice from cadmium chloride-induced toxicity by inhibiting cadmium-induced apoptosis in kidney and liver, *Toxicol. Lett.*, **299**, 56-66 (2018).
12. S. Chakraborty, A.R. Dutta, S. Sural, D. Gupta, S. Sen, Ailing bones and failing kidneys: a case of chronic cadmium toxicity. *Ann. Clin. Biochem.*, **50**(5), 492-495 (2013).
13. T. Luo, J. Lee, Z. Lu *et al.*, Effect of cadmium ion on alpha-glucosidase: an inhibition kinetics and molecular dynamics simulation integration study, *Protein J.*, **35**(3), 218-224 (2016).
14. M.J. Tamás, B. Fauvet, P. Christen, P. Goloubinoff, Misfolding and aggregation of nascent proteins: a novel mode of toxic cadmium action in vivo, *Curr. Genet.*, **64**(1), 177-181 (2018).
15. A. Sarkar, G. Ravindran, V. Krishnamurthy, A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level, *Int. J. Biotechnol. Res.*, **3**(1), 17-36 (2013).
16. L.P. Pereira, F.E.B. Silva, E.M.M. Flores, H.S. Schrekker, M.M. Machado, L.F.S. Oliveira, *In vitro* ZnCl₂ cytotoxicity and genotoxicity in human leukocytes: Zero-order kinetic cellular zinc influx, *Acta Sci. Health Sci.*, **37**(1), 63-68 (2015).
17. T. Sliwinski, A. Czechowska, M. Kolodziejczak, J. Jajte, M. Wisniewska-Jarosinska, J. Blasiak, Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells, *Cell Biol. Int.*, **33**(4), 542-547 (2009).
18. R. Guan, T. Kang, F. Lu, Z. Zhang, H. Shen, M. Liu, Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.*, **7**(1), 602 (2012).
19. R. Sharif, P. Thomas, P. Zalewski, M. Fenech, Zinc deficiency or excess within the physiological range increases genome instability and cytotoxicity, respectively, in human oral keratinocyte cells, *Genes Nutr.*, **7**(2), 139-154 (2012).
20. M.E. Burow, C.B. Weldon, Y. Tang *et al.*, Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants, *Cancer Res.*, **58**(21), 4940-4946 (1998).

21. R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson *et al.*, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutag.*, **35**(3), 206-221 (2000).
22. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, **175**(1), 184-191 (1988).
23. S. Wang, Q. Dong, Z. Wang, Differential effects of citric acid on cadmium uptake and accumulation between tall fescue and Kentucky bluegrass, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **145**, 200-206 (2017).
24. X. Chen, Z. Wang, G. Zhu, G.F. Nordberg, T. Jin, X. Ding, The association between cumulative cadmium intake and osteoporosis and risk of fracture in a Chinese population, *J. Exp. Sci. Environ. Epid.*, DOI: 10.1038/s41370-018-0057-6
25. W.J. Zhao, Z.J. Zhang, Z.Y. Zhu *et al.*, Time-dependent response of A549 cells upon exposure to cadmium, *J. App.Toxicol.*, **38**(11), 1437-1446 (2018).
26. J. Ramos-Trevino, S. Bassol-Mayagoitia, J.A. Hernández-Ibarra, P. Ruiz-Flores, M.P. Nava-Hernández, Toxic Effect of Cadmium, Lead, and Arsenic on the Sertoli Cell: Mechanisms of Damage Involved, *DNA Cell Biol.*, **37**(7), 600-608 (2018).
27. J.A. Sauvageau, C. Jumarie, Different mechanisms for metal-induced adaptation to cadmium in the human lung cell lines A549 and H441, *Cell Biol. Toxicol.*, **29**(3), 159-173 (2013).
28. H. Wang, Y. Yu, J. Li *et al.*, Cadmium stimulates mouse skin fibroblast apoptosis by affecting intracellular homeostasis, *Drug Chem. Toxicol.*, **40**(1), 74-84 (2017).
29. Y. Lin, J.J. Huang, H.U. Dahms, J.J. Zhen, X.P. Ying, Cell damage and apoptosis in the hepatopancreas of Eriocheir sinensis induced by cadmium, *Aquat. Toxicol.*, **190**, 190-198 (2017).
30. S. Sarkar, P. Yadav, R. Trivedi, A.K. Bansal, D. Bhatnagar, Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **9**(3), 144-149 (1995).
31. S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**(2), 321-336 (1995).
32. M.W. Fariss, Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes, *Toxicol.*, **69**(1), 63-77 (1991).

33. Y. Yan, J.C. Bian, L.X. Zhong, Y. Zhang, Y. Sun, Z.P. Liu, Oxidative stress and apoptotic changes of rat cerebral cortical neurons exposed to cadmium in vitro, *Biomed. Environ. Sci.*, **25**(2), 172-181 (2012).
34. Z. Dong, P. Saikumar, G.A. Griess, J.M. Weinberg, M.A. Venkatachalam, Intracellular Ca^{2+} thresholds that determine survival or death of energy-deprived cells. *Am. J. Pathol.*, **152**(1), 231-240 (1998).
35. B.E. Trump, I.K. Berezesky, S.H. Chang, P.C. Phelps, The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis, *Toxicol. Pathol.*, **25**(1), 82-88 (1997).
36. F. Thévenod, J. Fels, W-K. Lee, R. Zarbock, Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: myths and facts, *Biometals*, **1**, 1-21 (2019).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

V. Fontoura dos Santos, E.A. Serpa, F.E. Barcellos da Silva, É.M. de Moraes-Flores, M. Mansur-Machado, L.F.S. Oliveira, CdCl_2 has zero-order kinetic cellular influx and induces cytotoxicity and genotoxicity at low concentrations in human leukocytes in vitro, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 145-158 (2019).

A descrição matemática do processo da detecção eletroquímica do ácido ascórbico sobre o polímero condutor, dopado pelo íon triiodeto

Volodymyr V. Tkach^{1,2}, Marta V. Kushnir¹, Sílvio C. de Oliveira², Zholt O. Kormosh³, Olga V. Luganska⁴, Volodymyr V. Parchenko⁵, Yana G. Ivanushko⁶, Petró I. Yagodynets¹

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

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

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

³Universidade Nacional Leste-Europeia, 43000, Av. da Liberdade, 13, Luts'k, Ucrânia

⁴Universidade Nacional de Zaporizhzhya, Faculdade de Biologia, 69095, Rua de Zhukovs'ky, 66, Zaporizhzhya, Ucrânia.

⁵Universidade Estatal de Medicina de Zaporizhzhya, 69000, Av. de Maiakovs'ky, 26, Zaporizhzhya, Ucrânia.

⁶Universidade Estatal de Medicina de Chernivtsi, Departamento de Medicinas Militar e Emergencial, 58000, Rua de Olga Guzar, 2, Chernivtsi, Ucrânia.

Recebido em: 6 de fevereiro de 2018

Aceito em: 25 de fevereiro de 2019

RESUMO

O desempenho do polímero condutor, dopado pelo íon triiodeto, na detecção eletroquímica do ácido ascórbico foi avaliado matematicamente. O modelo matemático, correspondente ao sistema, foi desenvolvido e analisado mediante a teoria de estabilidade linear e de bifurcações. Verificou-se que o polímero condutor pode servir de excelente modificador de eletrodo para a detecção do ácido ascórbico, sendo o triiodeto a substância ativa, e o polímero condutor o mediador. O estado estacionário mantém-se estável facilmente, o que corresponde à vasta zona da linearidade da dependência entre a concentração do fármaco e o parâmetro eletroquímico. A possibilidade das instabilidades oscilatória e monotônica também foi verificada.

Palavras-chave: Ácido ascórbico, sensores eletroquímicos, polímero condutor, triiodeto, eletrooxidação, estado estacionário estável.

SUMMARY

The mathematical description for the process of the electrochemical detection of ascorbic acid over a conducting polymer, doped by a triiodide ion

The function of the conducting polymer, doped by triiodide ion in the electrochemical determination of the ascorbic acid has been mathematically evaluated. The mathematical model, correspondent to the system, was developed and analyzed by linear stability theory and bifurcation analysis. It was confirmed that the conducting polymer might be an excellent electrode modifier for ascorbic acid determination. The triiodide ion acts as the active substance, and the conducting polymer, as a mediator. The stable steady-state is easy maintain, which is correspondent to the vast zone of the linear dependence between the drug concentration and electrochemical parameter. The possibility of oscillatory and monotonic instabilities has also been verified.

Key words: Ascorbic acid, electrochemical sensors, conducting polymer, triiodide, electrooxidation, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Ácido ascórbico (3-oxo-L-gulofuranolactona-(5R)-5-[(1S)-1,2-diidroxi-etil]-3,4-diidroxi-furano-2(5H)-ona, número CAS: 50-81-7), ou seja, a vitamina C, é um composto importante para o metabolismo humano [1-3]. Participando de várias reações bioquímicas na célula, tem por sua principal função a hidroxilação de colágeno [4]. Outrossim, ele é um forte antioxidante [5-6] e participa da biossíntese de neurotransmissores e hormônios [7].

A sua falta provoca uma doença, conhecida como escorbuto [8-9], conhecida também como doença dos marinheiros (por exemplo, Vasco da Gama, durante a viagem à Índia, perdeu a maioria dos seus marinheiros por escorbuto), que se caracteriza pelas hemorragias nas gengivas, tumefação purulenta das gengivas (inchaço com pus), dores nas articulações, feridas que não cicatrizam, além de desestabilização dos dentes. O escorbuto como doença dos marinheiros foi mencionado até em *Os Lusíadas* de Luís de Camões, (Canto V, Estâncias 81 - 82):

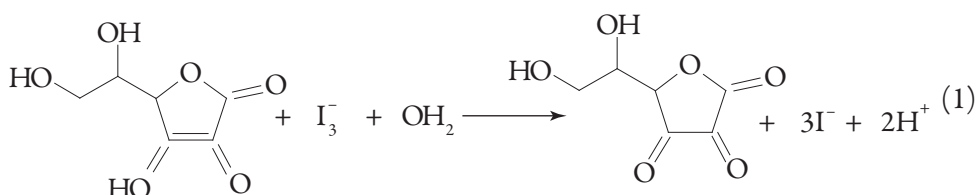
[...] E foi, que de doença crua e feia
A mais que eu nunca vi, desepararam
Muitos a vida, e em terra estranha e alheia
Os ossos para sempre sepultaram.
Quem haverá que sem ver o creia?

Que tão disformemente ali lhe incharam
As gengivas na boca, que crescia
A carne, e juntamente apodrecia,

Apodrecia com fétido e bruto
Cheiro, que o ar vizinho infeccionava.
Não tínhamos ali médico astuto,
Surugião sutil menos se achava:
Mas qualquer, neste ofício pouco instruto,
Pela carne já podre assim cortava,
Como se fora morta; e bem convinha,
Pois que morto ficava quem a tinha. [...]

Hodiernamente, o ácido ascórbico é amplamente utilizado como fármaco em doses, que excedem significativamente as necessidades diárias do organismo humano, para prevenção ou tratamento de muitas doenças [10]. Entretanto, apesar de ser, em geral, um composto de pouca toxicidade, provoca, quando usado em concentrações excessivas, outros efeitos colaterais, por exemplo, aumenta a sorção de ferro pelo organismo [11], pode causar a dita oxalúria [12], náusea, diarreia e outras influências no sistema digestivo. Ademais, ele é capaz de interagir com outros fármacos, impedindo a sua função [13-15]. Destarte, o desenvolvimento de um método rápido e eficiente da detecção da sua concentração é realmente uma questão atual [16], e a aplicação dos processos eletroanalíticos ser-lhe-ia uma ótima solução.

A metodologia clássica da detecção e quantificação do ácido ascórbico consiste na titulação das soluções, que, alegadamente, a contêm, pelo íon triiodeto, conforme a reação a seguir [17]:



Esta metodologia poder-se-ia instrumentalizar, usando os elétrodos específicos, modificados pelos polímeros condutores ou outros compostos (mesmo sendo micromoleculares), capazes de ser dopados pelos íons triiodeto e iodeto, inclusive os triazólicos, tetrazólicos, piridínicos, quinolínicos e acridínicos [18-20]. A dopagem dos polímeros condutores pelo íon triiodeto já tem sido realizada e descrita em [21].

Sem embargo, tanto o desenvolvimento das novas metodologias eletroanalíticas, bem como a modificação das já existentes para o certo caso, ainda dependem da resolução de certos problemas como:

- A indecisão acerca do mecanismo de imobilização e dopagem do íon e da sua interação com o ácido ascórbico nas condições da matriz.
- A possibilidade das instabilidades eletroquímicas, características para a oxidação anódica dos compostos orgânicos pequenos (um dos quais é o ácido ascórbico) [22 -25].

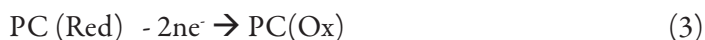
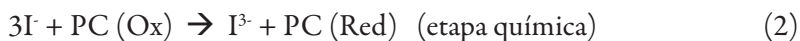
A resolução destes problemas não é possível sem desenvolver e analisar um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema. A modelagem também nos deixa comparar o seu comportamento com o dos sistemas análogos.

Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho é a investigação teórica mecanística da oxidação eletroquímica do ácido ascórbico sobre o polímero condutor, dopado pelo íon triiodeto. A sua resolução é alcançada pela realização dos objetivos específicos como:

- A sugestão de um mecanismo da eletrooxidação do ácido, incluindo a participação do polímero condutor e do íon triiodeto.
- O desenvolvimento de um modelo matemático, que descreve adequadamente o sistema.
- A análise do modelo e a sua interpretação em termos de estabilidade do estado estacionário, bem como nos termos eletroanalíticos.
- A comparação do comportamento deste sistema com o dos semelhantes [25 - 28].

O SISTEMA E O SEU MODELO

O sistema eletroanalítico é realizado na base de uma titulação clássica, que se realiza conforme a reação (1). A reversibilidade do elétrodo, destarte, realiza-se mediante as reações (2 - 3) a seguir:



que ocorre na matriz polimérica, que funciona como mediador de transferência de elétrons

Assim, trata-se de um processo eletroanalítico com uma transferência de elétrons do sistema sensível ao sistema analítico, mediada pela matriz polimérica condutora. Obter-se-á, destarte, um sistema, que é descrito por um conjunto de equações, análogo ao já descrito ainda em 2011 [25], mas com retificações, relativas ao comportamento dos íons dentro da matriz.

Este conjunto de equações tem três variáveis:

c : a concentração do ácido ascórbico na camada pré-superficial.

ι : o grau de recobrimento da matriz polimérica pelo íon iodeto.

θ : o grau de recobrimento da superfície do elétrodo pelo polímero condutor na sua forma reduzida.

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 concentraional 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:

$$\begin{cases} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 \right) \\ \frac{d\iota}{dt} = \frac{1}{G} (r_1 - r_2) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{P} (r_2 - r_3) \end{cases} \quad (4)$$

em que Δ é o coeficiente da difusão do ácido ascórbico, c_0 , a sua concentração no interior da solução, G e P são as concentrações máximas do iodeto na matriz e do polímero na superfície do elétrodo e os parâmetros r são as velocidades das respectivas reações, que se podem calcular como:

$$r_1 = k_1 c (1 - \iota) \exp(j\iota) \quad (5)$$

$$r_2 = k_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta) \quad (6)$$

$$r_3 = k_3 \theta \exp\left(\frac{2nF\varphi_0}{RT}\right) \quad (7)$$

Em que os parâmetros k são as constantes das respectivas reações, as variáveis j e ω descrevem as influências das mudanças das composições da matriz polimérica e do próprio polímero na dupla camada elétrica (DCE), n é o número dos sítios na matriz, onde, no início da reação, é hospedado o triiodeto, F é o número de Faraday, φ_0 é o salto do potencial do eletrodo, relativo ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases e T é a temperatura absoluta do vaso.

Haja vista a presença de mais influências na dupla camada elétrica que no caso mais simples, descrito em [25], o comportamento do sistema tornar-se-á mais dinâmico, isto é, mais complicado, o que será exposto embaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema com a detecção do ácido ascórbico, assistida pelo polímero condutor, dopado pelos íons triiodeto, analisamos o conjunto de equações diferenciais (4) mediante a teoria de estabilidade linear. Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi, para este caso, podem ser descritos conforme:

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

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1(1-\iota)\exp(j\iota) \right) \quad (9)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_1 c \exp(j\iota) - jk_1 c(1-\iota)\exp(j\iota)) \quad (10)$$

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

$$a_{21} = \frac{1}{G} (k_1(1-\iota)\exp(j\iota)) \quad (12)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} (-k_1 c \exp(j\iota) + jk_1 c(1-\iota)\exp(j\iota) - k_2 \exp(-j\iota)\exp(\omega\theta) + jk_2 \iota \exp(-j\iota)\exp(\omega\theta)) \quad (13)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G}(-\omega k_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta)) \quad (14)$$

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

$$a_{32} = \frac{1}{P}(k_2 \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta) - jk_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta)) \quad (16)$$

$$a_{33} = \frac{1}{P}\left(\omega k_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta) - k_3 \exp\left(\frac{2nF\varphi_0}{RT}\right) - \omega k_3 \theta \exp\left(\frac{2nF\varphi_0}{RT}\right)\right) \quad (17)$$

Observando as expressões (9), (13) e (17), é possível ver que o comportamento oscilatório, neste caso, é possível, porque na diagonal principal da matriz Jacobiana existem elementos de signo positivo, correspondentes à positiva conexão de retorno.

No entretanto, ao contrário do caso mais simples, descrito em [25], bem como dos semelhantes [26-27], a DCE é afetada não só aquando da etapa eletroquímica, senão também durante as químicas. Tanto as composições iônicas da matriz como a composição química do polímero em relação ao grau e tipo de dopagem influenciam as capacitâncias da dupla camada elétrica e a coação dessas influências ao longo do processo eletroanalítico fará com que a probabilidade do comportamento oscilatório aumente. Deveras, não só o elemento $-\omega k_3 \theta \exp\left(\frac{2nF\varphi_0}{RT}\right) > 0$, se $\omega < 0$, pode ser positivo, como nos sistemas [25 – 28], mas também os outros, $jk_1 c(1-\iota) \exp(j\iota) > 0$, $jk_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta) > 0$, se $j < 0$, bem como o $\omega k_2 \iota \exp(-j\iota) \exp(\omega\theta) > 0$, se $\omega > 0$, todos, correspondentes às influências das reações químicas nas capacitâncias da DCE. As oscilações se esperam mais frequentes que nos casos mais simples [25 – 28] e de amplitude menor.

Para investigar a *estabilidade do estado estacionário* neste sistema, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (4) o critério Routh-Hurwitz.

Para investigar a estabilidade do estado estacionário neste sistema, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (4) o critério de estabilidade Routh-Hurwitz. Evitando a aparição de expressões grandes, introduzimos as novas variáveis, de modo que o determinante jacobiano se descreva como:

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

Abrindo os parênteses e aplicando à expressão (18) a inequação $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade sob a forma de:

$$-\kappa_1 (\Omega P + \Omega \Lambda + \Phi \Lambda) - \Xi \Phi \Lambda < 0 \quad (19)$$

O requisito (19) satisfar-se-á de forma garantida, no caso da positividade dos parâmetros Ω , P , Λ e Φ , que descreve a fraqueza das já mencionadas influências da dupla camada elétrica. Vista a maior quantidade dos processos que influenciam a DCE que nos casos mais simples [25 – 28], a zona topológica da estabilidade do estado estacionário far-se-á mais estreita. Porém, mesmo nesta zona mais estreita, o estado estacionário estável far-se-á eletroanaliticamente eficiente e correspondente à linearidade da dependência entre a concentração do ácido ascórbico e o parâmetro eletroquímico (neste caso, a corrente), já que não há fatores externos e colaterais, capazes de comprometer a estabilidade do analito e do modificador.

A expressão (19) é típica para processos, controlados pela difusão. No entretanto, isso é válido apenas quando os parâmetros Ξ e Ω têm valores relativamente grandes, ou seja, quando a matriz polimérica é capaz de hospedar o triiodeto na concentração suficiente. Caso contrário, o processo eletroanalítico far-se-á controlado pela reação.

No caso da igualdade das influências desestabilizadoras às estabilizadoras, realiza-se a *instabilidade monotônica*, cuja aparição é condicionada à satisfação da equação de:

$$-\kappa_1 (\Omega P + \Omega \Lambda + \Phi \Lambda) - \Xi \Phi \Lambda = 0 \quad (20)$$

No ponto desta instabilidade, correspondente ao limite de detecção, para o sistema definem-se vários estados estacionários, cada qual instável, dos quais o sistema escolhe apenas um, que se destrói, mudando-se as condições do sistema.

Caso as influências das etapas químicas para a DCE sejam menosprezíveis, os valores de ω anular-se-ão, fazendo-se as exponências iguais a um e transformando-se o conjunto de equações diferenciais (4) no descrito [25].

CONCLUSÕES

A análise do sistema eletroanalítico da detecção do ácido ascórbico, assistida pelo polímero condutor, dopado pelos íons triiodeto deixou concluir que:

- Apesar de haver mais processos, que influenciam a capacitância e a estrutura da dupla camada elétrica, o processo eletroanalítico far-se-á eficiente.
- A linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico e a concentração manter-se-á na faixa mais estreita que no caso mais comum, mas, mesmo assim, ampla.
- A depender da capacidade da matriz polimérica de hospedar os íons triiodeto, o processo eletroanalítico far-se-á controlado pela difusão ou pela reação.
- O comportamento oscilatório, neste sistema, é mais provável que nos análogos, dada a maior quantidade das reações que influenciam a capacitância e a estrutura da dupla camada elétrica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
2. <https://www.drugs.com/cdi/ascorbic-acid.html>, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
3. M. de Vuono Camargo, “Vitaminas. Aspectos nutricionais, Bioquímicos, Clínicos e Analíticos” São Paulo, 2003.
4. S. Murad, D. Grove, K.A. Lindberg *et al.*, Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2879-2882 (1981).
5. W.M. Cort, Ascorbic acid. Chemistry, metabolism and uses, *Advances in Chemistry*, **200**, 533 (1982).
6. S.J. Padayatti, A. Katz, Y. Wang *et al.*, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.*, **22**, 18-35 (2003).
7. M. Walingo, Role of Ascorbic Acid (Vitamin C) in a Human Health. A Review, *Afr. J. Food Agr. Nutr. Dev.*, **5**, 1-13 (2005). <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/7699/1/nd05011.pdf>

8. <http://emedicine.medscape.com/article/125350-overview>, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
9. <http://www.indiaporuguesa.com/a-viagem-de-vasco-da-gama.html>, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
10. M.D. Mashkovskiy, “Livro de fármacos”, Moscou, 2012, 16ª Edição Revista e ampliada em russo.
11. B. Teucher, M. Olivares, H. Cori, Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids, *Intr. J. Vit. Nutr. Res.*, **74**, 403-419 (2004).
12. J. Lamarche, R. Nair, A. Peguero C. Courville, Vitamin C-Induced Oxalate Nephropathy, *Int. J. Nephrol.*, **2011**, 146927 (2011).
13. <https://www.drugs.com/drug-interactions/ascorbic-acid,vitamin-c.html>, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
14. <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement-interaction/possible-interactions-with-vitamin-c-ascorbic-acid>, acesso aos 23 de janeiro de 2017.
15. D.S. Oliveira, Interação medicamentosa, Parte I. Cad., *Farm. UFRGS.*, **2**, 3-20 (1986).
16. L.A. Pachla, D.L. Reynolds, P.T. Kissinger, Analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products, and pharmaceuticals, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1-12 (1985).
17. N. Baccan, J.C. de Andrade, O.E. Godinho, J.S. Barone, “Química analítica quantitativa elementar”, Blucher, São Paulo, SP, 2012.
18. J.P. Tosar Rovira, “Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a electrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias”, Tesis licenciatura en Bioquímica, Universidad de la República, Montevideo, 2008.
19. A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas, Electrochemical sensors, based on conducting polymer polypyrrole, *Electrochim. Acta*, **51**, 6025-6037 (2006).
20. T. McQuade, A. Pullen, T.M. Swager, Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors, *Chem. Rev.*, **100**, 2537-2574 (2000).

21. T. Hanawa, H. Yoneyama, Gas Sensitivities of Electropolymerized Polythiophene, *Films Synth. Met.*, **30**, 341-350 (1989).
22. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Met.* **140**, 207-223 (2004).
23. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern Formation and Oscillatory Electropolymerization of Thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798-1803 (2008).
24. M. Bazzouai, E.A. Bazzouai, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc- lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73-83 (2002).
25. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P. I. Yagodynets', Y. Meslyuk, Mathematical model of the work of the mediated conducting polymer sensors with the use of the polymers of heterocyclic compounds, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **77**, 259-266 (2011).
26. 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**, 203-216 (2012).
27. 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**, 145-153 (2017).
28. 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**, 1-7 (2015).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, Z.O. Kormosh, O.V. Luganska, V.V. Parchenko, Y.G. Ivanushko, P.I. Yagodynets', A descrição matemática do processo da detecção eletroquímica do ácido ascórbico sobre o polímero condutor, dopado pelo íon triiodeto, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 159-169 (2019).

Análisis teórico de la posibilidad de la detección electroquímica de la sacarina, asistida por oxihidróxido de vanadio

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Marta V. Kushnir¹, Sílvio C. de Oliveira², Olga Luganska³, Vasyl Lorents¹, Olga V. Pishak¹, Roman R. Boychuk¹, Petro I. Yagodynets¹

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

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

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

³Universidad Nacional de Zaporizhzhya, Facultad de Biología, 69095, Calle de Zhukovs'ky, 66, Zaporizhzhya, Ucrania.

Recibido para evaluación: 12 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 25 de febrero de 2019

RESUMEN

Mediante el análisis mecanístico teórico, ha sido evaluada la posibilidad del empleo del oxihidróxido de vanadio como modificador de electrodo para la detección electroquímica de sacarina. El proceso electroanalítico se realiza a través de un proceso catódico. El modelo matemático correspondiente ha sido analizado mediante la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones. El análisis del modelo ha mostrado que el oxihidróxido de vanadio puede ser un modificador eficiente para la detección electroquímica de la sacarina en las condiciones del pH suficientemente ácido para mover el proceso, pero insuficiente para disolver el oxihidróxido. Las causas de los comportamientos oscilatorio y monotónico también fueron estipuladas.

Palabras claves: Sacarina, electrodos químicamente modificados, oxihidróxido de vanadio trivalente, sensores electroquímicos, estado estacionario estable.

SUMMARY

The theoretical analysis of the possibility of the electrochemical determination of saccharin, assisted by vanadium (III) oxyhydroxide

By means of the theoretical mechanistic analysis, the possibility of the use of vanadium oxyhydroxide as electrode modifier for saccharin electrochemical determination has been evaluated. The electroanalytical process is realizing by a cathodic route. The correspondent mathematical model has been analyzed by means of the linear stability theory and bifurcation analysis. The analysis of the model has shown that the vanadium oxyhydroxide is an efficient electrode modifier for saccharin electrochemical detection in pH sufficiently low to maintain the process, but insufficiently acidic to dissolve the oxyhydroxide. The causes for the oscillatory and monotonic instabilities have also been derived.

Key words: Saccharin, chemically modified electrodes, trivalent vanadium oxyhydroxide, electrochemical sensors, stable steady-state.

INTRODUCCIÓN

La sacarina (E954, 2H-1λ6,2-benzotiazol-1,1,3-triona, número CAS 81-07-2) es un edulcorante artificial, que suele utilizarse con frecuencia, tanto en la industria alimentaria, como en formulaciones farmacéuticas [1-3]. Ella es considerada 500 veces más dulce que el azúcar y 1,5 más dulce que el aspartamo. Pasando por el organismo humano con pequeño grado de metabolismo, se usa en alimentación especial para diabéticos [4]. Ella tiene potencial de ser antídoto para casos de envenenamiento por compuestos de metales pesados [5].

Sin embargo, como la sacarina contiene un conjunto con potencial tóxico (CO – NH – SO₂, o CO – NNa – SO₂, en su forma soluble) su uso es conjugado con varios efectos colaterales [6-10], por ejemplo, reacciones alérgicas y alteración de microbiota intestinal, puede provocar cáncer. Así, el desarrollo de un método eficiente, barato y rápido para su detección y cuantificación es una tarea actual [11-13], y los métodos electroquímicos pueden servirle de respuesta interesante.

Varios métodos electroanalíticos han sido desarrollados [14-16] o previstos [17-18] para la sacarina, en los que varios modificadores han sido usados. Un material interesante con potencial para ser modificador de cátodo para la reducción electroanalítica de la sacarina podría ser el oxihidróxido de vanadio ($\text{VO}(\text{OH})$), un material análogo al oxihidróxido de cobalto, estable en la banda de pH entre 3 y 14, pero con un comportamiento electroquímico más inclinado para catódico, pudiendo ser sustancia activa o mediador.

Por otro lado, por ahora, ningún método electroanalítico, que use el oxihidróxido de vanadio con sacarina o cualquier otro analito ha sido desarrollado. Solamente un trabajo [19], en que $\text{VO}(\text{OH})$ es usado como modificador de electrodo en condensadores, ha sido publicado. De otra parte, el desarrollo y uso práctico de nuevos métodos electroanalíticos puede implicar la resolución de ciertos problemas como:

- La necesidad de combinar los parámetros de estabilidad de sustancias, que participen en el acto electroanalítico, con los de la mayor eficiencia del proceso electroanalítico.
- La posibilidad de la aparición de inestabilidades electroquímicas, que ya han sido observadas durante el desempeño del oxihidróxido de cobalto [20-21], que es un compuesto semejante.

Teniendo en cuenta lo citado, el análisis teórico a priori es necesario para describir un sistema con potencial electroquímico. Así, el objetivo general de este trabajo es el análisis aplicado para el sistema con la detección electroquímica de sacarina en el cátodo y modificado por $\text{VO}(\text{OH})$. El modelo matemático, capaz de describir adecuadamente el comportamiento del sistema, se desarrolla y analiza mediante la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones. Del análisis se concluye acerca de la eficiencia del proceso en la detección electroanalítica de la sacarina y, también se compara el comportamiento de este proceso con otros procesos los semejantes [17, 18, 22, 23].

EL SISTEMA Y SU MODELO

El esquema del proceso electroanalítico, en el que la reducción electroquímica de la sacarina es asistida por el oxihidróxido de vanadio, puede ser descrita como:

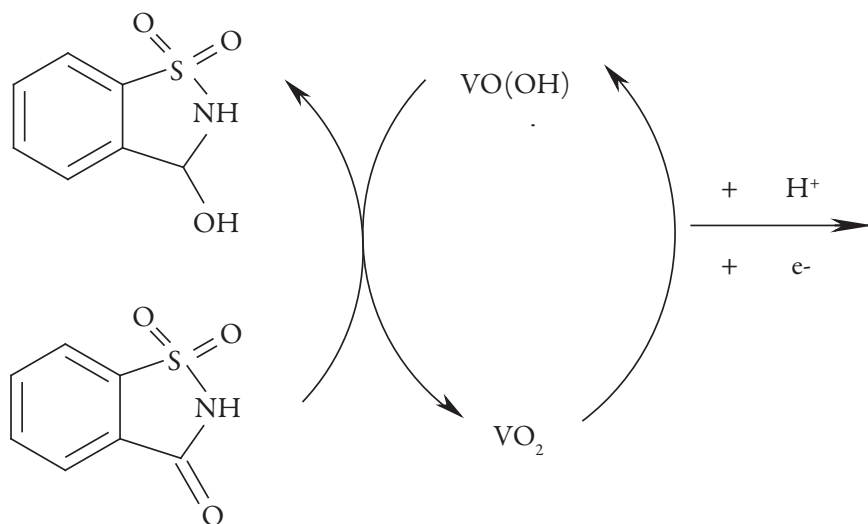


Figura 1. El esquema del desempeño de VO(OH) como modificador del cátodo en la reducción electroquímica de la sacarina.

Como se puede ver, el medio ácido es necesario para la realización del proceso electroanalítico. Entretanto, mantener el pH en valores muy bajos, inferiores a 3 llevará a la disolución de VO(OH):



Esta reacción se realiza sin oxidación o reducción, pero causa alteración en las capacitancias de la doble capa eléctrica (DCE), fuerza iónica y composición de la superficie. Si el oxihidróxido de vanadio está presente en la superficie de un material polimérico o carbónico como componente de la matriz, la disolución puede ser parcial o hasta no ocurrir, solo haciendo que el ion del vanadio trivalente permanezca en la matriz.

Así, para describir el comportamiento de este sistema introducimos tres variables:

c: la concentración de la sacarina en la capa presuperficial.

v: el grado de recubrimiento de la superficie por el oxihidróxido de vanadio.

h: concentración de los protones en la capa presuperficial.

Para simplificar el modelo, suponemos que el reactor se agite intensamente, lo que nos deja menospreciar el flujo de convección. Consecuentemente, suponemos que el electrólito de soporte esté presente en su exceso, dejándonos menospreciar el flujo de migración. Suponemos, también, que el perfil concentracional de las sustancias en la capa presuperficial sea lineal, y su espesor, constante e igual a δ .

Es posible mostrar que, considerando lo citado, el comportamiento del sistema será descrito por un conjunto de ecuaciones diferenciales conforme:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_1 \right) \\ \frac{dv}{dt} = \frac{1}{G} (r_2 - r_1 - r_3) \\ \frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (h_0 - h) - r_2 - r_3 \right) \end{array} \right. \quad (2)$$

En que D y Δ son los coeficientes de difusión de los protones y de la sacarina, c_0 y h_0 , sus concentraciones en la capa presuperficial, G es la concentración superficial máxima del oxihidróxido de vanadio en la superficie del cátodo y los parámetros r son las velocidades de las reacciones de la reducción de sacarina, regeneración y disolución del oxihidróxido de vanadio, que se pueden calcular como:

$$r_1 = k_1 cv \quad (3)$$

$$r_2 = k_2 h (1 - v) \exp \left(-\frac{F\varphi_0}{RT} \right) \quad (4)$$

$$r_3 = k_3 h^3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \quad (5)$$

En que los parámetros k son constantes de velocidades de las respectivas reacciones, F es el número de Faraday, φ_0 es el salto de potencial en la doble capa eléctrica (DCE), relacionado al potencial de carga cero, las variables β y ρ describen las influencias superficiales y electroquímicas de la disolución VO(OH) a las capacitancias de la DCE, R es la constante universal de gases y T es la temperatura absoluta.

Como se ve, la presencia de un medio ácido es necesaria para mantener el proceso electroanalítico “en el aire”. Sin embargo, las soluciones fuertemente ácidas llevan a la disolución del oxihidróxido e inestabilidades vinculadas a esta disolución, lo que será descrito abajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar el comportamiento del sistema con la detección electroquímica de sacarina en soluciones ácidas, mediante un proceso de reducción, asistida por el oxihidróxido de vanadio, analizamos el conjunto de ecuaciones diferenciales (2), mediante la teoría de estabilidad linear. Los elementos estacionarios de la matriz funcional de Jacobi se presentan así:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (6)$$

en que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_1 v \right) \quad (7)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (-k_1 c) \quad (8)$$

$$a_{13} = 0 \quad (9)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} (k_1 v) \quad (10)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(-k_2 h \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - j k_2 h (1-v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - k_1 c - k_3 h^3 \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right. \\ \left. + \beta k_3 h^3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) + \rho k_3 h^3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right) \quad (11)$$

$$a_{23} = \frac{1}{G} \left(k_2 (1-v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - 3 k_3 h^2 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right) \quad (12)$$

$$a_{31} = 0 \quad (13)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} \left(-k_2 h \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - j k_2 h (1-v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - k_3 h^3 \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right. \\ \left. + \beta k_3 h^3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) + \rho k_3 h^3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right) \quad (14)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{D}{\delta} - k_2 (1-v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - 3 k_3 h^2 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) \right) \quad (15)$$

Es posible ver que *el comportamiento oscilatorio* en este sistema es más probable que en los semejantes. Hay tres factores responsables por este tipo de comportamiento, contra uno o dos en los sistemas semejantes [17, 18, 22, 23].

Para que la condición principal de la bifurcación de Hopf (que describe el comportamiento oscilatorio) se satisfaga, es preciso que los elementos de la diagonal principal de la matriz (7), (11) y (15) contengan elementos positivos, correspondientes a la positiva conexión del retorno. No solo el elemento $-jk_2(1-v)\exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) > 0$ si $j < 0$, que describe las influencias a la DCE de la electroreducción de VO_2 típicas para sistemas semejantes [17, 20, 21], sino el elemento $\beta k_3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0) > 0$ si $\beta > 0$, que describe la atracción de las partículas durante la disolución de $\text{VO}(\text{OH})$ y el $\rho k_3 v \exp(-\beta v) \exp(-\rho \varphi_0)$ si $\rho > 0$, que describe las influencias en la CDE, causadas por la formación de los iones V^{3+} cerca del cátodo. Las oscilaciones se esperan frecuentes y de poca amplitud.

Para investigar la *estabilidad de estado estacionario* aplicamos al conjunto de ecuaciones diferenciales (2) el criterio Routh-Hurwitz. Evitando las expresiones grandes introducimos nuevas variables para que el determinante del Jacobiano se describa como:

$$\frac{4}{\delta^2 G} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & -\Lambda & 0 \\ \Xi & \Omega - \Lambda - \Phi & \Sigma - \text{P} \\ 0 & -\Omega - \Phi & -\Sigma - \text{P} - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (16)$$

Abriendo los paréntesis y aplicando el requisito $\text{Det } J < 0$, según el criterio, se obtiene la condición de estabilidad del estado estacionario descrita como:

$$-\kappa_1 \left(\frac{2\Omega \Sigma + \Lambda \Sigma + 2\Phi \Sigma + \Lambda \text{P} + \Omega \kappa_2}{+\Lambda \kappa_2 + \Phi \kappa_2} \right) - \Xi \left(\frac{2\Omega \Sigma + 2\Lambda \Sigma + 2\Phi \Sigma + 2\Lambda \text{P} + \Omega \kappa_2}{+2\Lambda \kappa_2 + \Phi \kappa_2} \right) < 0 \quad (17)$$

Este requisito se satisface de forma garantizada, no habiendo influencias fuertes en la DCE y en la superficie, y, así, manteniéndose positivos los valores de los parámetros Ω y Φ . Consecuentemente, teniendo los dichos parámetros valores positivos, lo que se obtiene, cuando las variables β y ρ mantienen valores nulos o negativos, el estado estacionario se hará estable.

Entretanto, en este sistema, al contrario de la mayor parte de los semejantes [17, 18, 22, 23] la estabilidad de estado estacionario, en el aspecto más general no garantiza la eficiencia electroanalítica. De veras, siendo los valores de los parámetros Φ y

P superiores a los de los demás parámetros del sistema (lo que ocurre, cuando el oxihidróxido de vanadio se disuelve de la superficie formando los cationes V^{3+}), el proceso electroanalítico no se realizará, es decir, no tendrá el sentido estipulado, aunque el estado estacionario permanezca estable.

Así, con el pH bajo, la probabilidad de la realización de inestabilidades electroquímicas en el sistema electroanalítico se hará mayor. Por eso, a pesar de la manutención muy probable de la estabilidad del estado estacionario en los valores bajos de pH, para que se realice la eficiencia electroanalítica del sistema es preciso usar las soluciones frágil o moderadamente ácidas, pudiendo hasta llegar a valores neutros ($3 < \text{pH} \leq 7$).

Satisfechas las condiciones de eficiencia electroanalítica del estado estacionario, la curva de la dependencia entre el parámetro electroanalítico y la concentración del analito se mantendrá lineal. Es decir, la señal electroanalítica se hará fácil de interpretar.

El proceso electroanalítico se hará controlado por la difusión, o por la reacción, dependiendo de la concentración de la sacarina, del pH, del tamaño del cátodo y de la dispersión del $\text{VO}(\text{OH})$ en su superficie).

La *inestabilidad monotónica* en este sistema también es posible. Su condición principal es $\text{Det } J = 0$, lo que, para este sistema corresponde a:

$$-\kappa_1 \begin{pmatrix} 2\Omega \Sigma + \Lambda \Sigma + 2\Phi \Sigma + \Lambda P + \Omega \kappa_2 \\ + \Lambda \kappa_2 + \Phi \kappa_2 \end{pmatrix} - \Xi \begin{pmatrix} 2\Omega \Sigma + 2\Lambda \Sigma + 2\Phi \Sigma + 2\Lambda P + \Omega \kappa_2 \\ + 2\Lambda \kappa_2 + \Phi \kappa_2 \end{pmatrix} < 0 \quad (18)$$

En términos electroanalíticos, esta inestabilidad es correspondiente al límite de detección, y en este punto coexisten varios estados estacionarios, todos inestables. El sistema escoge apenas uno, y este se autodestruye, cuando las condiciones del sistema se alteran.

En el caso de la nulidad de los parámetros β y ρ , las exponentes incluidas en la velocidad de la disolución se harán iguales a 1, y el comportamiento del sistema se hará más estable y menos dinámico. Aún, si la disolución de $\text{VO}(\text{OH})$ no ocurre o sea menospreciablemente lenta, lo que deja anular el elemento r_3 y todos los elementos de la matriz, que son derivados de él. Eso también hará el comportamiento del sistema más próximo de los semejantes [17, 18, 22, 23]

CONCLUSIONES

El análisis teórico de la posibilidad de la detección electroquímica de la sacarina, asistida por el oxihidróxido de vanadio trivalente, se concluye que:

- Para la mayor eficiencia de reducción electroanalítica, es preferible usar los valores de pH, suficientes para mantener la reducción electroanalítica, pero insuficientes para disolver el modificador del cátodo, es decir, satisfaciendo el pH la condición $3 < \text{pH} \leq 7$.
- Dependiendo de varios factores del sistema, el proceso electroanalítico se controlará por la difusión o por la reacción.
- El comportamiento oscilatorio en este sistema se hará más probable, visto que hay más factores superficiales y electroquímicos, capaces de causarlo.
- La probabilidad de este tipo de comportamiento aumenta cuando hay valores relativamente bajos de pH, las oscilaciones se esperan frecuentes y de pequeña amplitud, que, mismo así, se mantendrá dependiente del pH.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. S. Miao, E.S. Beach, T. J. Sommer *et al.*, High-Intensity Sweeteners in Alternative Tobacco Products, *Nicot. Tob. Res.*, **23**(141), 2169-2173 (2016).
2. V.M. Sardesai, T.H. Valdshan, Natural and synthetic intense sweeteners, *J. Nutr. Biochem.*, **2**, 236-244 (1991).
3. K. Rosenman, Benefits of Saccharin. A Review, *Environm. Res.*, **15**, 70-80 (1978).
4. S.A. Miller, V.P. Fratalli, Saccharin, *Diab. Care*, **12**, 75-80 (1989).
5. K.M.A. Malik, S.Z. Haider, M.A. Hossain, Dipotassium sodium trisaccharinate monohydrate, $\text{K}_2\text{Na}(\text{C}_7\text{H}_4\text{NO}_3\text{S})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, *Acta Crystall. C.*, **40**, 1696-1698 (1984).
6. J. Suez, T. Korem, D. Zeevi *et al.*, Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiot, *Nature*, **514**, 181-186 (2014).
7. M.R. Torloni, M.U. Nakamura, A. Megale *et al.*, O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil, *Rev. Bras. Gin. Obstetr.*, **29**, 267-275 (2007).

8. A. Saad, F.A. Khan, A. Hayee, M.S. Nazir, A Review on potential toxicity of artificial sweetners vs safety of stevia: A natural bio-sweetner, *J. Biol. Agr. Health*, **4**, 137-147 (2014).
9. M.R. Weinbrauch, V. Diehl, Artificial sweeteners do they bear a carcinogenic risk, *Ann. Oncol.*, **15**, 1460-1465 (2004).
10. J. Whysner, G.M. Williams, Saccharin mechanistic data and risk assessment: urine composition, enhanced cell proliferation, and tumor promotion, *Pharmacol. Ther.*, **71**, 225- 252 (1991).
11. S.N.F. Bruno, C.R. Cardoso, M.M.A. Maciel *et al.*, Selective identification and quantification of saccharin by liquid chromatography and fluorescence detection, *Food Chem.*, **159**, 309-315 (2014).
12. V.N. Oliveira Fernandes, L. Bellozi Fernandes, J. Pereira Vasconsellos *et al.*, Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection, *Anal. Meth.*, **5**, 1524-1532 (2013).
13. K. Kh. Khamud, R.R. Neema, I.Sh. Hamza, E.A. Salih, Qualitative and Quantitative Determination of Artificial Sweetener Saccharin Sodium by FTIR Spectroscopy, *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.*, **3**, 617-622 (2014).
14. O. Fatibello-Filho, J. Araújo, A.J. Moraes, Flow injection potentiometric determination of saccharin in dietary products with relocation of filtration unit, *Talanta*, **41**, 731-734 (1994).
15. I. Tabakovic, S. Riemer, K. Tabakovic *et al.*, Mechanism of Saccharin Transformation to Metal Sulfides and Effect of Inclusions on Corrosion Susceptibility of Electroplated CoFe Magnetic Films, *J. Electrochem. Soc.*, **153**, 586-593 (2006).
16. D.P. Nikolettis, S. Pantoulis, S.J. Krull *et al.*, Electrochemical transduction of the interactions of the sweeteners acesulfame-K, saccharin and cyclamate with bilayer lipid membranes (BLMs), *Electrochim. Acta*, **46**, 1025-1031 (2001).
17. V.V. Tkach, G. Ivanushko, S. M. Lukanova *et al.*, The Theoretical Evaluation of Saccharin Electrochemical Detection on CP-Based Diazonium Salts, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 1044-1054 (2016).
18. V.V. Tkach, G. Ivanushko, S. M. Lukanova *et al.*, Detecção eletroquímica de sacarina em meio neutro por polímeros condutores especificamente modificados: Uma descrição matemática, *Bol. Inf. Geum.*, **7**, 12-17 (2016).

19. Y. Zhang, X. Jing, Hydrothermal synthesis and supercapacitor electrode of low crystallinity VOOH hollow spheres with pseudocapacitance in aqueous solution, *Mat. Lett.*, **205**, 1-5 (2017).
20. O. Stadnik, Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt, Diss. Kand. Chim. N.-Kyiv 2011.
21. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218, Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract # 2240, <http://ma.ecsdl.org/content/MA201002/38/2240.full.pdf> accessed at 8th of August 2015.
22. V. Tkach, S.C. de Oliveira, F.J. Anaissi *et al.*, The Mechanism of Electroanalytical Function of CoO(OH) in the Oxalic Acid Electrochemical Determination and its Mathematical Representation, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 1-11 (2016)
23. V. Tkach, Y. Ivanushko, S. C. de Oliveira *et al.*, A avaliação mecanística teórica da utilização de oxihidróxido de cobalto (III) em sensores eletroquímicos de tramadol, *Rev. Colomb. Cien. Quím. Farm.*, **46**(2), 188-201 (2017).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, O. Luganska, V. Lorents, O.V. Pishak, R.R. Boychuk, P.I. Yagodynets', Análisis teórico de la posibilidad de la detección electroquímica de la sacarina, asistida por oxihidróxido de vanadio, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 170-180 (2019).

Extracción de glicoalcaloides de papa nativa (*Solanum phureja*) variedad ratona morada con líquidos presurizados

Soany Eraso-Grisales, Diego Mejía-España, Andrés Hurtado-Benavides

Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA), Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Calle 18 Carrera 50, Torobajo, Pasto, Nariño, Colombia.

* Correo electrónico: ahurtadob@hotmail.com

Recibido para evaluación: 2 de noviembre de 2018

Aceptado para publicación: 27 de febrero de 2019

RESUMEN

La cáscara de papa es un residuo originado por su procesamiento agroindustrial, que genera un gran impacto ambiental debido a su inadecuado manejo o eliminación. No obstante, la cáscara de papa es una buena fuente de ingredientes funcionales como los glicoalcaloides (GA). Este estudio investigó la extracción de dos GA (α -solanina y α -chaconina) de cáscara de papa nativa (*Solanum phureja*) variedad ratona morada del departamento de Nariño-Colombia, utilizando la tecnología de extracción con líquidos presurizados (ELP), mediante un diseño experimental central compuesto, con el fin de determinar el efecto de la presión (P) y la temperatura (T), sobre el rendimiento y la composición de GA. Los extractos se analizaron por cromatografía líquida HPLC. Los resultados obtenidos permitieron establecer que la temperatura ejerció un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento, α -solanina y α -chaconina. El rendimiento óptimo fue de 5,62 % p/p. Los GA, α -solanina y α -chaconina, aumentaron su concentración al disminuir la temperatura. La extracción con líquidos presurizados promete ser una buena alternativa al uso de solventes orgánicos para obtener compuestos bioactivos de cáscara de papa.

Palabras claves: *Solanum phureja*, cáscara de papa, extracción con líquido presurizado, glicoalcaloides.

SUMMARY

Extraction of glycoalkaloids of native potato (*Solanum phureja*) ratona morada variety with pressurized liquids

Potato peel is a waste originated by its agro-industrial processing, generating an environmental impact due to its inadequate handling or elimination. However, potato peel is a good source of functional ingredients such as glycoalkaloids (GA). This study investigated the extraction of two GA (α -solanine and α -chaconine) from native potato rind (*Solanum phureja*) ratona morada variety from the department of Nariño-Colombia, using the technology of extraction with pressurized liquids (PLE), through a experimental central composite design, in order to determine the effect of pressure (P) and temperature (T), on the performance and composition of GA. The extracts were analyzed by liquid chromatography HPLC. The results obtained allowed us to establish that the temperature exerted a significant effect ($p < 0.05$) on the yield, α -solanine and α -chaconine. For the yield an optimum value of 5.62 % w/w was reached. α -solanine and α -chaconine increased their concentration as the temperature decreased. The extraction with pressurized liquids promises to be a good alternative in the use of organic solvents to obtain bioactive compounds of potato husk.

Key words: *Solanum phureja*, potato peel, extraction with pressurized liquid, glycoalkaloids.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*), es actualmente el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo después del maíz, el trigo y el arroz. Ocupa el tercer lugar después del arroz y el trigo en términos de consumo [1, 2]. La papa proporciona fuente de energía debido a sus niveles de carbohidratos y también contiene proteínas de alto valor. Sin embargo, su contenido de proteína es generalmente bajo. Es rica en micronutrientes como la vitamina C y algunas vitaminas B, también contiene niveles apreciables de minerales como potasio. El contenido de grasa de la papa cruda y cocida es muy bajo [3, 4].

La papa es un cultivo de origen montañoso y se ha domesticado en los altos Andes de Sudamérica [1]. La mayoría de las variedades cultivadas pertenecen a la especie *S. tuberosum*. Sin embargo, se cultivan otras especies de *Solanum*, las cuales se denominan especies silvestres o nativas (PN) [5] y presentan una gran diversidad genética. PN son de formas y tamaños variados, colores llamativos y exóticos. Existen papas de formas

aplanadas, redondas, comprimidas, alargadas, con ojos profundos; de colores de piel y pulpa amarilla, roja, rosada o morada [6], entre esta gran diversidad, se encuentra la papa nativa ratona morada, una variedad de papa muy cultivada en la zona rural del departamento de Nariño. Además, PN son un aporte a la seguridad alimentaria y la nutrición de las poblaciones vulnerables de las zonas rurales de los habitantes de los Andes [7].

La transformación de la papa en productos con valor agregado ha aumentado para satisfacer la demanda de los consumidores, lo que trae consigo que el consumo de papa fresca está disminuyendo continuamente. El procesamiento de esta, conduce a la generación de cantidades significativas de residuos, los cuales pueden comprender entre el 40 al 50 % de peso fresco del tubérculo, siendo la cáscara la fracción principal de los residuos de procesamiento [4]. Pese a que las cáscaras se consideran residuos pueden ser aprovechados para la obtención de productos de interés generando un valor agregado y mitigando la contaminación ambiental, que estas pueden generar cuando no son manejados adecuadamente. La cáscara de papa contiene ingredientes funcionales, que tienen particular interés en la industria farmacéutica, después de su extracción y purificación [4, 8, 9].

Si bien las papas son una fuente alimenticia rica en nutrientes, también poseen un grupo de sustancias tóxicas, compuestos llamados glicoalcaloides (GA) que se encuentran predominantemente en la piel [8]. Los glicoalcaloides son metabolitos secundarios en *Solanum* y otros miembros de la familia *Solanaceae*, que sirven como defensa química contra hongos, nematodos, herbívoros y otras condiciones de estrés, de los cuales la α -solanina y la α -chaconina son las más abundantes en los tubérculos de papa, representando más del 95 % [10]. Se componen de una cadena lateral hidrofílica de hidratos de carbono unida en la posición C3-OH de la parte esteroideal, solanidina (ver figura 1). La proporción de α -chaconina es mayor con respecto a α -solanina, que varía de 1,8:1 a 7:1 para papas frescas sin pelar [8]. Sus concentraciones son generalmente más altas en partes de plantas con una alta tasa de metabolismo, como hojas jóvenes y flores, con una disminución subsiguiente en partes con baja actividad metabólica en la madurez [11].

El interés en los GA de la papa surge del hecho de que diferentes estudios evidencian los efectos adversos de los mismos en altas concentraciones que pueden ser potencialmente dañinos para humanos y, a su vez estos poseen propiedades beneficiosas para la salud que los hace convenientes para su uso en la industria farmacéutica [12]. Se ha demostrado que los GA poseen propiedades antialérgicas, antipiréticas, antiinflamatorias, hiperglucémicas y antibióticas [11], anticancerígenas beneficiosas [12, 13]. Se ha observado que los GA de especies de *Solanum* podrían ser útiles contra la infección

por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pero son pocos los artículos que aborden este tema [14].

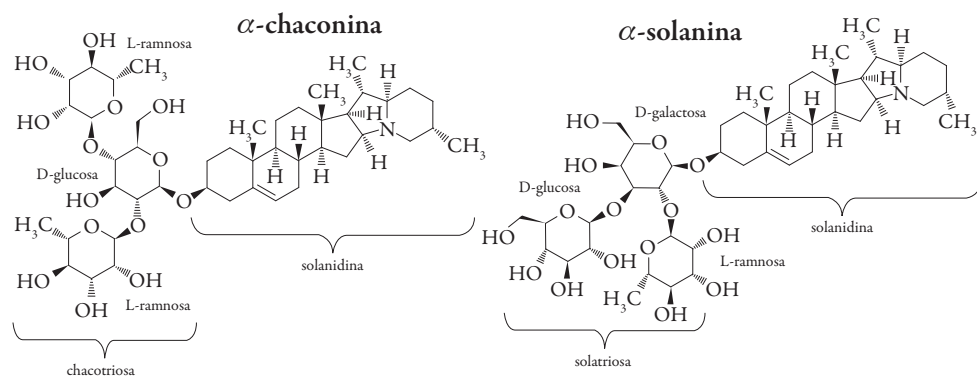


Figura 1. Estructuras químicas de los glicoalcaloides de la papa α -chaconina y α -solanina. Fuente: Mäder *et al.* (2009) [8].

Los GA se extraen utilizando técnicas tradicionales como lo son extracción Soxhlet y extracción sólido-líquido a presiones atmosféricas, usando una gran cantidad de solventes orgánicos los cuales suelen tener altos costos de adquisición y para ser descartados, además de su impacto ambiental negativo y otros problemas de salud humana emplean largos tiempos. Frente a esta problemática, en los últimos años, han surgido técnicas de extracción respetuosas con el medio ambiente como formas eficientes de aumentar la automatización, acortar el tiempo de extracción, reducir la cantidad de solventes orgánicos, al igual que la obtención de extractos más limpios debido a la baja o nula presencia de solventes. Estas técnicas se denominan “técnicas verdes de extracción”. La extracción con líquidos presurizados (ELP), especialmente con el uso de agua como solvente, es una tecnología emergente más ecológica en comparación con las técnicas de extracción convencionales [15, 16].

ELP es un proceso que combina temperatura y presión controladas con solventes líquidos para lograr una extracción rápida y eficiente de compuestos bioactivos de varias matrices de origen natural. Un beneficio importante ELP es que los solventes presurizados permanecen en estado líquido, incluso por encima de sus puntos de ebullición [17]. La alta presión, la temperatura o su combinación de las mismas aumentan la solubilidad de los compuestos, la velocidad de difusión del solvente y la transferencia de masa, mientras que la viscosidad del solvente y la tensión superficial disminuyen. En muchos casos, estas técnicas presentan algunas ventajas sobre técnicas convencionales,

como el uso de menores cantidades de solventes, requieren tiempos de extracción más cortos con una mayor selectividad o altos rendimientos de extracción [18].

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue la extracción de glicoalcaloides de cáscara de papa nativa (*Solanum phureja*) var. ratona morada con líquidos presurizados (ELP) utilizando agua como solvente, evaluando el efecto de la presión y la temperatura en la extracción, sobre el rendimiento y la composición, mediante la metodología de superficie de respuesta para optimizar los parámetros de extracción.

METODOLOGÍA

Materiales y reactivos

El material utilizado para la extracción fue cáscara de papa (*Solanum phureja*) de la variedad ratona morada, proporcionada por un productor del corregimiento del Encano (Latitud 1°8' 37.19" N, Longitud 77°10' 7.3" W) a 2791 m s.n.m, municipio de Pasto-Colombia. Se realizó un proceso de adecuación y secado por liofilización alcanzando una humedad de 5,19% b.s. Previo al proceso de extracción, la materia prima se molió en un molino de discos (Imusa), luego se pasó 100 g por un tamiz (modelo PS-35 serie 1182) en la serie de tamices (10-80, A.S.T.M.E-11.) por espacio de 10 minutos, de acuerdo a la norma ASTM E 11-95 [19]. Se realizó el análisis granulométrico y se determinó el diámetro medio de las partículas (0,427 mm).

Los glicoalcaloides estándares fueron α -solanina 98 % pureza (Sigma-Aldrich, USA) y α -chaconina 99,1 % pureza (Indofine, USA). Los solventes metanol 99,9 %, cloroformo 99,2 % y acetonitrilo 99,9 %; fueron de grado HPLC (Merck, Alemania), ácido clorhídrico 37,0 % e hidróxido de amonio (Merck, Alemania); las sales fosfato monopotásico 99,7 % y fosfato dipotásico 99,8 % (Merck, Alemania).

Extracción con líquidos presurizados (ELP)

Para la extracción de GA se utilizó agua tipo I; las extracciones se realizaron en un equipo de extracción SFE-100 (Waters, USA) de 100 mL de capacidad. El diagrama del proceso se indica en la figura 2. Se utilizó un diseño experimental tipo central compuesto, empleando la metodología de superficie de respuesta, en la que se consideraron dos factores: presión y temperatura sobre la influencia de las condiciones de extracción en el rendimiento y la composición, al igual que se determinó los puntos óptimos. Se evaluaron rangos de presión entre 60-100 bar y temperaturas entre 60-100 °C, cada extracción se realizó durante 40 minutos y se utilizaron 10 g de cáscara de papa seca y molida. Las variables presión y temperatura se controlaron a través de un sistema de regulación que opera mediante el software Process Suite (versión 5.9).

El extracto obtenido, se almacenó en un vial ámbar en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior secado por liofilización y análisis del contenido GA. El rendimiento se calculó como peso de extracto liofilizado obtenido sobre el peso de cáscara de papa seca utilizada en términos porcentuales (% p/p), mediante la ecuación 1:

$$RE = \left(\frac{PE}{PC} \right) * 100 \quad (1)$$

Dónde: RE: rendimiento de extracto (% p/p)

PE: peso del extracto obtenido (g)

PC: peso total de cáscara utilizada para cada extracción (g)

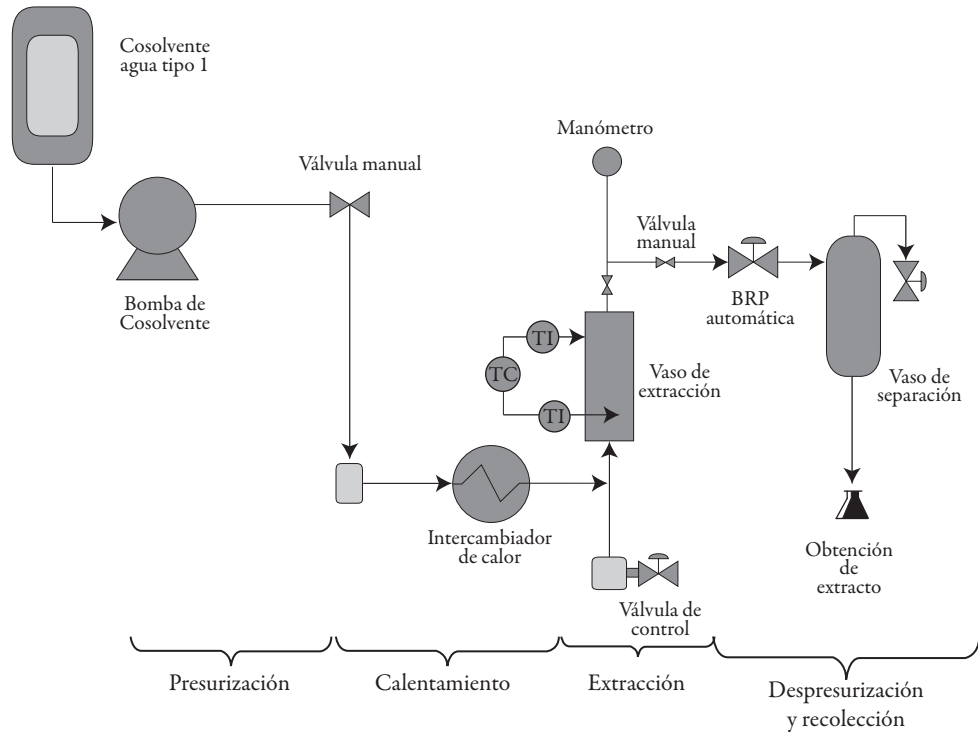


Figura 2. Diagrama de proceso de extracción con líquidos presurizados SFE-100.

Extracción sólido-líquido (ESL)

Para determinar el contenido de GA totales en papa se realizaron extracciones sólido-líquido con solvente. Las extracciones se hicieron a cáscara y brotes de papa fresca, pulpa de papa y papa liofilizada (cáscara). Para determinar la presencia de GA en las

matrices mencionadas, se siguió la metodología Hellenäs (1986) [20], con algunas modificaciones. Como solvente de extracción se utilizó una mezcla de metanol: clorofomo (2:1 v/v) en agitación magnética durante 1 hora, adición de ácido clorhídrico 0,2 N en agitación magnética durante 20 minutos, filtración, adición de hidróxido de amonio (25 %) para ajustar el pH a 11 y finalmente centrifugación para descartar el sobrenadante y obtener los GA.

Análisis de glicoalcaloides (GA) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA)

Se empleó la metodología planteada por la AOAC Oficial Method 997.13 (Glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconina in Potato Tubers) [21] para analizar glicoalcaloides en los extractos. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo, agua y solución buffer de fosfato (pH=7,6) (60 %, 30 %, 10 % v/v). Las condiciones de análisis fueron: temperatura de 40 °C, flujo de fase móvil 1,5 mL/min, longitud de onda de absorción a 205 nm y la separación se realizó en modo isocrático, el tiempo de análisis fue de 20 minutos. Se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Waters modelo Breeze, acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos PAD 2998 Scan (200-500 nm), en fase reversa con una columna Hypersil Gold C18 (250 mm* 4,6 mm ID* 5,0 μ m Dp), marca Thermo Scientific. El equipo consta de un inyector marca Rheodyne lopp de 20 μ L.

Mediante el método de patrón externo se determinó la concentración de GA en muestras de papa, utilizando curvas de estándares α -solanina y α -chaconina, con las correspondientes curvas de calibrado. Las curvas de los estándares, fueron realizadas a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 ppm), con coeficientes de correlación de 0,998 para α -solanina y de 0,997 para α -chaconina. Los tiempos de retención (TR) de los estándares fueron TR= 4,47 min para α -solanina y TR= 5,5 min para α -chaconina (ver figura 3). El contenido de GA se calculó a partir de las áreas de los picos. El factor de resolución (α) de α -solanina frente a α -chaconina se calculó en 1,33. El límite de detección (LOD) fue de 0,003 mg/ml y 0,004 mg/ml para α -solanina y α -chaconina respectivamente, mientras que los límites de cuantificación (LOQ) fueron de 0,011 mg/ml para α -solanina y de 0,017 mg/ml para α -chaconina. LOD y LOQ se determinaron como 3 y 10 veces la desviación estándar en la intersección con el eje y de las líneas de regresión estándar [22].

Análisis estadístico

La matriz de los diseños de experimentos y el análisis estadístico de los datos se llevó cabo con el software estadístico Statgraphics Centurion XV® (StatPoint Technologies, Inc., War-renton, gVA, USA). Se realizó el análisis de varianza para determinar la significancia del ($p < 0,05$) de los factores sobre la variable respuesta.

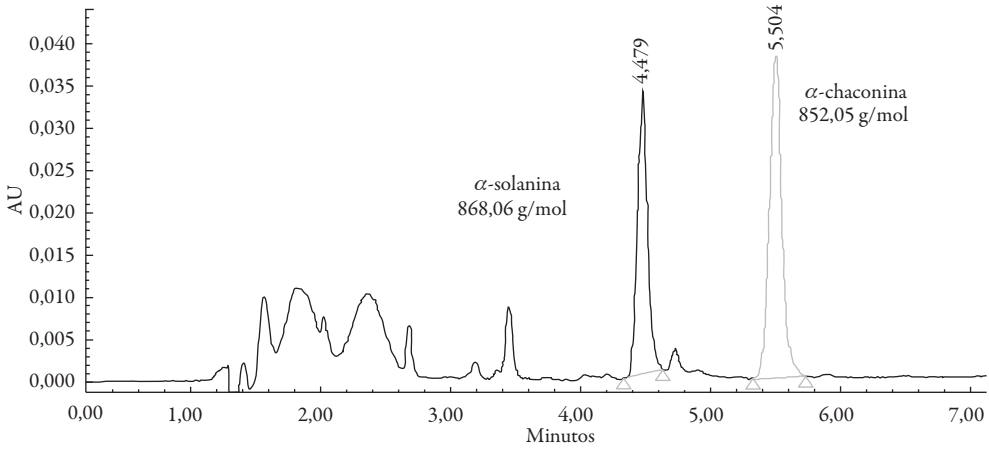


Figura 3. Perfil cromatográfico (HPLC-PAD) para estándares de glicoalcaloides (α -solanina y α -chaconina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de las extracciones ELP

Los rendimientos de extracción de papa seca y molida obtenidos mediante ELP se presentan en la tabla 1; las condiciones que optimizan el rendimiento son: 55,6 bar y 100 °C, obteniendo un valor óptimo de 5,62 % p/p. El análisis de varianza (ANOVA) determinó que la temperatura tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La figura 4 presenta la gráfica de superficie de respuesta que muestra el efecto de los factores evaluados en ELP. Se observa que el incremento de la temperatura conlleva a un aumento en el rendimiento.

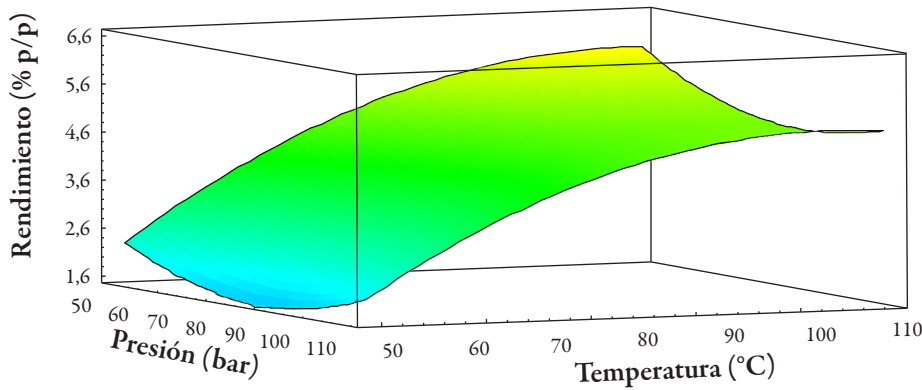


Figura 4. Gráficas de superficie de respuesta para rendimiento de extractos de papa (*S. phureja*) var. ratona morada obtenidos por ELP.

Las altas temperaturas favorecen la eficiencia de extracción al disminuir la viscosidad del solvente, lo que conduce a una mejor penetración dentro de la matriz que contiene los solutos de interés. Una ventaja importante de usar temperaturas más altas, es la mejora de la velocidad de difusión, es decir, la transferencia de masa de la molécula en el disolvente permite extracciones más rápidas [16, 17, 23].

Glicoalcaloides (GA) en ELP

Tabla 1. Resultados de rendimientos de extracción y contenido de GA y GAT en extractos de papa (*S. phureja*) var. ratona morada, obtenidos mediante ELP.

Condiciones de extracción		R* (% p/p)	α -solanina	α -chaconina	GAT	α -s (% p/p)	α -ch (% p/p)
P (bar)	T (°C)		(mg/100 g papa seca)				
60(-1)	100(+1)	5,55	0,566 ± 0,044	0,373 ± 0,004	0,939 ± 0,048	60,2	39,8
80(0)	52(-1,41)	2,29	0,806 ± 0,158	2,435 ± 1,219	3,240 ± 1,378	24,9	75,1
80(0)	80(0)	4,776	0,758 ± 0,255	1,202 ± 0,461	1,960 ± 0,119	38,7	61,3
80(0)	80(0)	4,133	0,872 ± 0,026	2,444 ± 0,755	3,315 ± 0,730	26,3	73,7
60(-1)	60(-1)	2,513	0,897 ± 0,378	1,124 ± 0,003	2,021 ± 0,382	44,4	55,6
80(0)	80(0)	3,108	0,685 ± 0,046	1,354 ± 0,509	2,040 ± 0,463	0,336	66,4
52(-1,41)	80(0)	5,299	1,389 ± 0,204	2,121 ± 1,411	3,510 ± 1,207	39,6	0,604
100(+1)	60(-1)	2,467	0,467 ± 0,036	0,587 ± 0,168	1,054 ± 0,204	44,3	55,7
80(0)	80(0)	4,774	0,820 ± 0,225	1,547 ± 0,021	2,368 ± 0,246	34,6	65,4
108(+1,41)	80(0)	4,407	1,131 ± 0,062	2,100 ± 0,159	3,231 ± 0,221	35,0	65,0
100(+1)	100(+1)	5,264	N.I.	N.I.	N.I.	-	-
80(0)	108(+1,41)	4,556	0,707 ± 0,037	0,914 ± 0,092	1,621 ± 0,130	43,6	56,4

*R: rendimiento; GAT: suma de α -solanina y α -chaconina; % p/p α -s: fracción de masa α -solanina; % p/p α -ch: fracción de masa α -chaconina; N.I.: no identificado.

Los resultados de GA y GAT en extractos obtenidos con ELP, bajo diferentes condiciones de presión y temperatura de extracción se muestran en la tabla 1, así como los niveles de las variables en unidades reales y codificadas entre paréntesis. Se observa que en la mayoría de las extracciones la fracción en masa es mayor para α -chaconina es siempre superior al de α -solanina, excepto a 60 bar - 100 °C y en la extracción de 100 bar - 100 °C, donde no se identificaron los compuestos bajo estudio. Para papa nativa (*S. phureja*) var. ratona morada se obtuvieron rangos de 24 a 60 % α -solanina y de 39

a 75 % de α -chaconina, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros estudios, quienes afirman que, en la mayoría de los casos, α -chaconina está presente en una cantidad ligeramente más alta [24, 25, 26]. Las condiciones que optimizan el contenido de GA y GAT son: 80 bar y 80 °C obteniendo un valor óptimo de 0,784; 1,637 y 2,420 mg/g de papa seca para α -solanina, α -chaconina y GAT respectivamente.

Hossain *et al.* (2015) [18] extrajeron alcaloides esteroidales (α -solanina, α -chaconina, solanidina y demissidina) de cáscaras de papa usando líquidos presurizados y entre los cuatro alcaloides encontrados, α -chaconina fue el más abundante seguido por α -solanina, con valores de 87,3 y 59,7 mg/g cáscara seca respectivamente. En la investigación mencionada se usó como líquido presurizado metanol al 89 % v/v a diferentes temperaturas con presión constante de 100 bar. Estos resultados son mayores a los obtenidos en el presente estudio; lo cual puede explicarse a la diferencia entre las muestras de papa, debido a la diversidad y variedad genética, condiciones de crecimiento y el almacenamiento poscosecha.

Tabla 2. Significancia estadística de los factores sobre GA y GAT en extractos de papa (*S. phureja*) var. ratona morada.

Fuente	p-Valor			
	Rendimiento	α -solanina	α -chaconina	GAT
A: presión	0,5258	0,0249	0,5127	0,2697
B: temperatura	0,0269	0,0034	0,0219	0,0138
AA	0,4345	0,9518	0,2355	0,3005
AB	0,8885	0,3493	0,6635	0,5909
BB	0,2575	0,4138	0,5936	0,5511
Falta de ajuste	0,6763	0,0631	0,1445	0,1388

La significancia estadística de los factores evaluados y sus interacciones sobre el rendimiento de extracción, el contenido de α -solanina, α -chaconina y GAT se muestra en la tabla 2. También se observa que la temperatura (B) fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) sobre las variables de respuesta bajo estudio. La presión (A) solo fue significativa en α -solanina; sin embargo, los efectos cuadráticos de la presión y la temperatura; las interacciones entre estos factores no presentaron efectos estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

La figura 5 presenta los gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto de la presión y la temperatura sobre el contenido de α -solanina, α -chaconina y GAT en ELP de cáscara de papa liofilizada. Como se puede observar, las concentraciones de los

compuestos bajo estudio en los extractos de papa, se incrementan significativamente al disminuir la temperatura y la presión.

La temperatura y la presión son parámetros importantes relacionados con la optimización de ELP. Las temperaturas más altas disminuyen la viscosidad de los solventes líquidos, lo que permite una mejor penetración de las partículas de la matriz y mejora la extracción. Además de reducir la viscosidad, las altas temperaturas también disminuyen la tensión superficial del solvente, los solutos y la matriz, permitiendo que el solvente “moje” la matriz de la muestra más a fondo. Se espera que la temperatura tenga un efecto pronunciado en obtención de GAT, debido a la importancia de la cinética de transferencia de masa y la solubilidad. Las temperaturas más usadas en la ELP están entre 80-100 °C; se ha reportado que la presión tiene poco efecto sobre la eficiencia de ELP [15, 27].

La temperatura máxima está limitada por la temperatura de degradación de cada analito. Sin embargo, un aumento de temperatura puede causar que algunas interferencias se extraigan conjuntamente con los analitos objetivos y disminuya la selectividad de la extracción, es por ello que temperaturas más bajas se utilizan comúnmente para evitar la degradación del analito o la coextracción de interferencias [28]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, presentaron un comportamiento contrario, ya que a menores temperaturas y presiones se obtuvo mayor cantidad GA y GAT; esto puede explicarse debido a que el calor y la presión tienen efectos similares; si son suficientemente altos, ambos inducen la gelatinización del almidón en exceso de agua, lo que da como resultado una transición de la estructura granular nativa a una pasta o gel de almidón de la papa [28].

Extracción sólido-líquido de GA

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos de la extracción sólido-líquido de diferentes partes del tubérculo. Los niveles más altos de GA se encuentran en los brotes y la cáscara, en menor cantidad en la pulpa; mientras que la papa liofilizada (materia prima utilizada en este estudio) presenta valores altos de GA y GAT, comparados con diferentes partes del tubérculo. De acuerdo a Milner *et al.* [29], la mayoría de las partes de la planta poseen GA. Las concentraciones en cultivos comerciales generalmente están en el rango de 0,0011 a 0,15 mg/100 g de peso fresco; sin embargo, en cultivares silvestres se observa una diferencia sustancial, con un contenido que oscila entre 6 y 432 mg/100 g peso fresco. Para el caso de papa nativa (*S. phureja*) var. ratona morada, las diferentes partes se encuentran dentro del rango reportado para papas silvestres, a excepción de la pulpa. Sin embargo, una variedad de factores ambientales, genéticos y de estrés, como el ataque de insectos, enfermedades, luz, madurez, daños mecánicos y temperaturas de almacenamiento causan contenidos elevados de GA en los tubérculos [30].

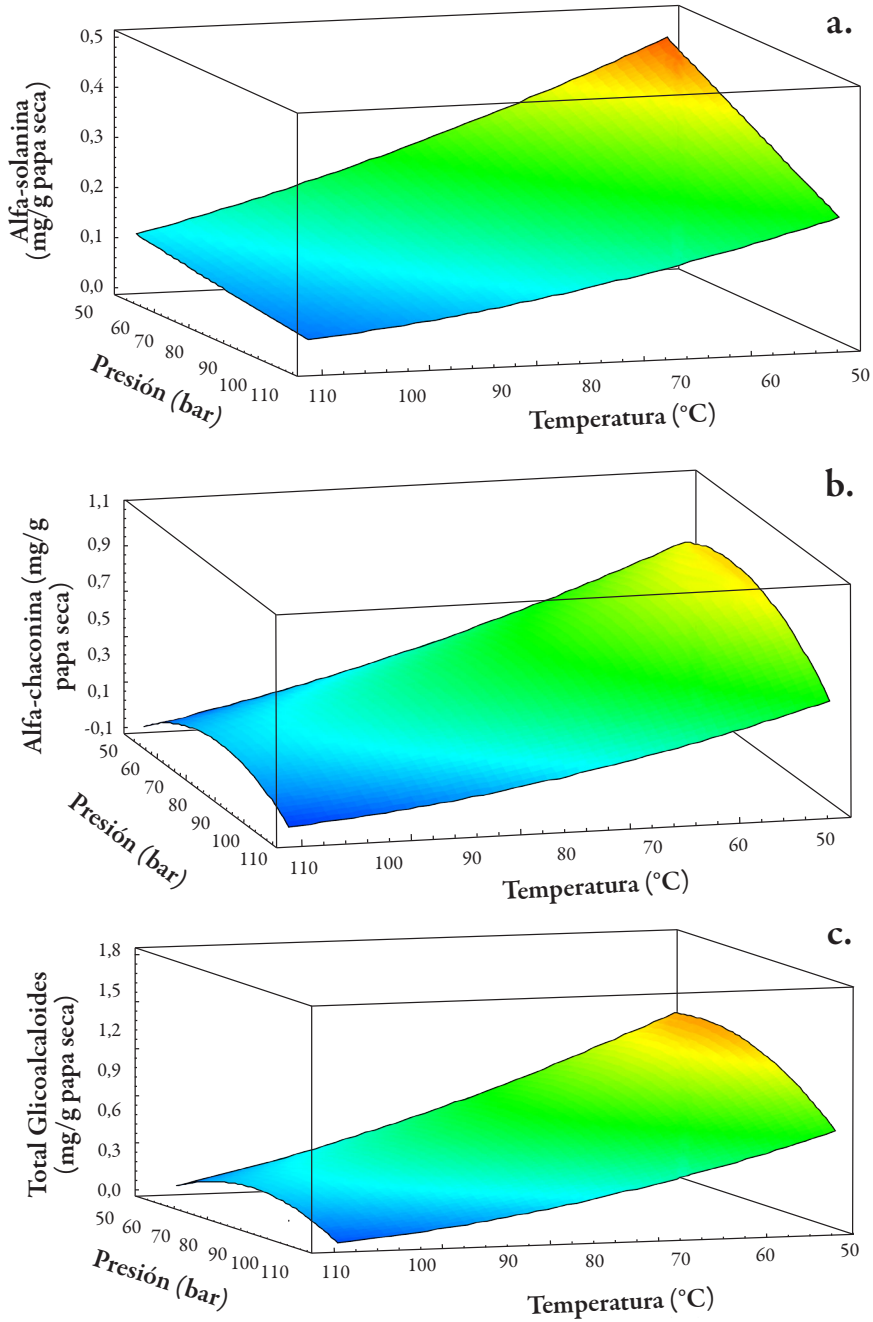


Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta de extractos de papa (*S. phureja*) var. ratona morada con ELP que muestran el efecto de la presión y la temperatura en el contenido de α -solanina (a), α -chaconina (b) y glicocalcoides totales (c).

Tabla 3. GA en extracción sólido-líquido de diferentes muestras de papa nativa (*S. phureja*) var. ratona morada.

Muestra	α -solanina	α -chaconina	GAT
	mg/100 g papa húmeda		
Cáscara y brotes (fresco)	10,78 $\pm$ 0,26	10,56 $\pm$ 0,13	21,34 $\pm$ 0,21
Pulpa (fresco)	1,37 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,02	2,75 $\pm$ 0,02
Papa liofilizada (cáscara)	26,84 $\pm$ 2,78	29,44 $\pm$ 5,44	56,28 $\pm$ 8,21

GA contribuyen a la defensa contra el ataque de plagas, de insectos o microorganismos al igual que la resistencia a las enfermedades; también pueden afectar la calidad del producto (sabor) y su seguridad para el consumo humano, si están presentes a niveles elevados. GA no se distribuyen uniformemente a través del tubérculo, las altas concentraciones generalmente se asocian con áreas que están experimentando una alta actividad metabólica, como brotes, cáscaras y el área alrededor de los “ojos” de la papa. La mayoría se encuentra dentro del primer 1 mm de la superficie externa del tubérculo, con concentraciones que disminuyen hacia el centro del tubérculo [11, 30, 32], tal como se evidencia en los resultados obtenidos (ver tabla 3).

El contenido de GAT en las variedades de papa disponibles comercialmente, en tubérculos de papa no procesados para consumo humano debe ser inferior a 200 mg/kg de peso fresco, este nivel es recomendado por la FAO [29, 33]. Para el caso de papa nativa (*S. phureja*) var. ratona morada, los niveles obtenidos para pulpa, cáscara y brotes fresco, se encuentran dentro de lo recomendado por la FAO. La dosis letal humana estimada por ingesta oral es de 3-6 mg de GA de papa por kilogramo de peso corporal [31]. Por otro lado, los resultados de glicoalcaloides totales obtenidos para papa liofilizada superaron el nivel recomendado por la FAO; datos reportados por Sotelo y Serrano [34] para 12 variedades de papa en México, obtuvieron un rango de 2,90-91,63 mg/100 g de papa húmeda para glicoalcaloides totales; de esta manera el resultado obtenido en el presente estudio, se encuentra dentro del rango obtenido por los autores mencionados.

De acuerdo a lo reportado por Handling *et al.* (1996) [35] y Sánchez *et al.* [36], las muestras de papa secas tienen un contenido de glicoalcaloides (α -solanina y α -chaconina) más altos, que las muestras frescas. Para papa liofilizada, se observa que la fracción en masa es mayor para α -chaconina que de α -solanina, reafirmando así que, en la mayoría de los casos, α -chaconina está presente en una cantidad ligeramente más alta [24, 25, 26].

CONCLUSIONES

Se extrajeron glicoalcaloides a partir de cáscara de papa, utilizando agua presurizada como solvente de extracción. Solamente la temperatura tuvo un efecto estadísticamente

significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento, el contenido de α -solanina y α -chaconina. La técnica de optimización mediante superficie de respuesta, permitió predecir los parámetros de extracción óptimos dentro de los parámetros experimentales, siendo 55,6 bar-100 °C para rendimiento y 80 bar-80 °C para glicoalcaloides. Los extractos presentaron como glicoalcaloide mayoritario α -chaconina. La extracción sólido-líquido permitió constatar la mayor concentración de glicoalcaloides en cáscara y brotes. Los extractos obtenidos pueden ser de interés para la industria farmacéutica por la presencia de glicoalcaloides.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías de Colombia y a la Universidad de Nariño por el apoyo financiero para la ejecución del proyecto “Mejoramiento tecnológico y productivo del Sistema papa en el departamento de Nariño”. Al programa de “Jóvenes investigadores e innovadores” del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias y a la Universidad Nacional de Colombia-Palmira.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. H. Akyol, Y. Riciputi, E. Capanoglu, M. F. Caboni, V. Verardo, Phenolic Compounds in the Potato and Its Byproducts: An Overview, *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(6), 835 (2016).
2. A. Chandrasekara, T.J. Kumar, Roots and tuber crops as functional foods: A Review on phytochemical constituents and their potential health benefits, *International Journal of Food Science*, **15**(2016).
3. N.U. Haase, Healthy aspects of potatoes as part of the human diet, *Potato Research*, **51**(3-4), 239-258 (2008).
4. A. Schieber, M. Aranda, Potato peels: a source of nutritionally and pharmacologically interesting compounds-A review, *Global Science Books, Food* **2**, 23-29 (2009).

5. B. Burlingame, B. Mouillé, R. Charrondière, Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes, *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 494-502 (2009).
6. C. Monteros, X. Cuesta, J. Jiménez, G. López, “Las papas nativas en el Ecuador”. INIAP - Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Ed., Quito, 2005, p. 26.
7. C. Fonseca, G. Burgos, F. Rodríguez, L. Muñoz, M. Ordinola, “Catálogo de variedades de papa nativa con potencial para la seguridad alimentaria y nutricional de Apurímac y Huancavelica”, Centro Internacional de la Papa (CIP) Ed., Lima, 2014, p. 29.
8. J. Mäder, H. Rawel, L.W. Kroh, Composition of phenolic compounds and glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine during commercial potato processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(14), 6292-6297 (2009).
9. H. Gebrechistos, W. Chen, Utilization of potato peel as eco-friendly products: A review, *Food Science & Nutrition*, **6**, 1352-1356 (2018).
10. M. Friedman, C. Levin, Analysis and Biological Activities of Potato Glycoalkaloids, Calys tegine Alkaloids, Phenolic Compounds, and Anthocyanins, En: “Advances in Potato Chemistry and Technology”, Ed por J. Singh, y L. Kaur, Elsevier, Burlington MA, Massachusetts, 2009, pp. 127-161.
11. M. Friedman, Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(23), 8655-8681 (2006).
12. M. Friedman, Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **63**, 3323-3337 (2015).
13. M. Friedman, K.R. Lee, H.J. Kim, I.S. Lee, N. Kozukue, N, Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6162-6169 (2005).
14. J. Araujo, R. Salas, Actividad antimicrobiana de plantas, *Revista Científica del Sur*, **6**, 6-18 (2008).
15. A. Nieto, F. Borrell, E. Pocurull, R. Marcé, Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**(7), 752-764 (2010).

16. A. Mustafa, Ch. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta*, **703**, 8-18 (2011).
17. P. Raut, D. Bhosle, A. Janghel, S. Deo, Ch. Verma, S. Kumar, M. Agrawal, N. Amit, M. Sharma, T. Giri, D. Tripathi, A. Ajazddin, Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **8**(6), 801-810 (2015).
18. M. Hossain, A. Rawson, I. Aguiló, N. Brunton, D. Rai, Recovery of steroidal alkaloids from potato peels using pressurized liquid extraction, *Molecules*, **20**, 8560-8573 (2015).
19. Estándar de ASTM E 11 “Standard Specification for Wire Cloth and Sieves for Testing Purposes”, 1995.
20. K.E. Hellenäs, A simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by HPLC: comparison with ELISA and a colorimetric method, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **37** (8), 776-782 (1986).
21. A.O.A.C. Glycoalkaloids (α -Solanine and α -Chaconina) in Potato Tubers. Liquid Chromatographic Method. 997.13. (1997), *Official methods of analysis of AOAC*. International 17th edition; Gaithersburg, MD, USA Association of Analytical Communities 2000.
22. N.J. Miller, J.C. Miller, “Estadística y quiometría para química analítica”, Pearson educación Ed. S.A., Madrid, 2002, 4ª edición.
23. K. Ameer, H. Muhammad, J.H. Kwon, Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **16**, 295-315 (2017).
24. M. Friedman, Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds, *Journal of Chromatography A*, **1054**, 143-155 (2004).
25. A. Tajner-Czopek, M. Jarych-Szyska, G. Lisińska, Changes in glycoalkaloids content of potatoes destined for consumption, *Food Chemistry*, **106**(2), 706-711 (2008).
26. P.H. Jensen, Analysis and fate of toxic glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* in the terrestrial environment. Department of Basic Sciences and Environment, University of Copenhagen, 2008, p. 79.

27. R. Carabias, E. Rodríguez, P. Revilla, J. Hernández, Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, *Journal of Chromatography A*, **1089**, 1-17 (2005).
28. K. Vallons, L. Ryan, E. Arendt, Pressure induced gelatinization of starch in excess water, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54**(3), 399-409 (2014).
29. S. Milner, N. Brunton, P. Jones, N. O'Brien, S. Collins, A. Maguire, Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **59**(8), 3454-3484 (2011).
30. D. Matthews, H. Jones, P. Gans, S. Coates, L. Smith, Toxic secondary metabolite production in genetically modified potatoes in response to stress, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **53**, 7766-7776 (2005).
31. R. Machado, M. Toledo, L. Garcia, Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers, *Food Control*, **18**, 503-508 (2007).
32. L. Shepherd, Ch. Hackett, C. Alexander, J. McNicol, J. Sungurtas, D. McRae, K. McCue, W. Belknap, H. Davies, Impact of light-exposure on the metabolite balance of transgenic potato tubers with modified glycoalkaloid biosynthesis, *Food Chemistry*, **200**, 263-273 (2016).
33. P. Jensen, B. Strobel, H. Hansen, S. Jacobsen, Fate of toxic potato glycoalkaloids in a potato field, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **57**, 2862-2867 (2009).
34. A. Sotelo, B. Serrano, High-Performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **48**, 2472-2475 (2000).
35. P. Handling, N. Issue, M. Cantwell, M. A review of important facts about potato glycoalkaloids, *Perishables Handling Newsletter*, **2**(87), 26-27 (1996).
36. A.F. Sánchez, E. Mudge, M.G. Gänzle, A. Schieber, Extraction and fractionation of phenolic acids and glycoalkaloids from potato peels using acidified water/ethanol-based solvents, *Food Research International*, **65**, 27-34 (2014).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

S. Eraso-Grisales, D. Mejía-España, A. Hurtado-Benavides, Extracción de glicoalcaloides de papa nativa (*Solanum phureja*) variedad ratona morada con líquidos presurizados, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 181-197 (2019).

ABSTRACTS OF IBEROAMERICAN PHARMACOMETRICS NETWORK CONGRESS GUADALAJARA, MÉXICO. NOVEMBER 7TH-9TH 2018

Scientific Committee

Name	Affiliation
Teresa Dalla Costa	Pharmacokinetics and PK/PD Modeling Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
Manuel Ibarra	Pharmaceutical Sciences Department, Faculty of Chemistry, Bioavailability and Bioequivalence Centre for Medicine Evaluation, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
Elba M. Romero-Tejeda	Pharmacobiology Department, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Paula Schaiquevich	National Scientific and Technical Research Council, Buenos Aires, Argentina Unit of Clinical Pharmacokinetics, Hospital de Pediatría JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina
Rodrigo Cristofolletti	Division of Therapeutic Equivalence, Brazilian Health Surveillance Agency, Brasilia, Brazil Center for Pharmacometrics and Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Orlando, Florida, USA
Ignacio Hernández González	Development Department, Isotopes Centre, Mayabeque, Cuba
Nicte S. Fajardo-Robledo	Pharmacobiology Department, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Marcela Aragón Novoa	Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
Marisin Pecchio	Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, Panamá, República de Panamá
Ignacio Cortinez	Department of Anaesthesiology, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
Iñaki F. Trocóniz	Pharmacometrics and Systems Pharmacology, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain

Organizing Committee

Name	Affiliation
Iberoamerican Committe	
Elba M. Romero-Tejeda	Pharmacobiology Department, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Guadalajara, Mexico
Iñaki F. Trocóniz	Pharmacometrics and Systems Pharmacology, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain
Manuel Ibarra	Pharmaceutical Sciences Department, Faculty of Chemistry, Bioavailability and Bioequivalence Centre for Medicine Evaluation, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
Teresa Dalla Costa	Pharmacokinetics and PK/PD Modeling Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
Mexican Committe	
Ruth Padilla Muñoz	Dean of the University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Jaime Andrade Villanueva	Dean of the University Health Sciences Center, University of Guadalajara, Mexico
Oscar Blanco Alonso	Director of the Division of Basic Sciences, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Ma. del Refugio Torres Vitela	Head of the Department of Pharmacobiology, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Germán Cardona Muñoz	Head of the Department of Physiology, University Health Sciences Center, University of Guadalajara, Mexico
Miguel Ángel Macías Islas	Postgraduate Coordinator of Pharmacology, Physiology Department, University Health Sciences Center, University of Guadalajara, Mexico
Nicte S. Fajardo-Robledo	Pharmacobiology Department, University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Mexico
Edsaúl Emilio Pérez Guerrero	Research Institute in Biomedical Sciences, Medical Clinic Department, University Health Sciences Center, University of Guadalajara, Mexico

ORAL PRESENTATIONS

Semi-mechanistic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic model of three pegylated rHuEPO and ior®EPOCIM in New Zealand rabbits

Reynaldo-Fernández G.¹, Solozábal J.², Amaro D.², Fernández-Sánchez EM¹, Rodríguez-Vera L.¹, Bermejo M.³, Mangas-Sanjuan V.⁴, Troconiz I.F.⁵

¹Department of Pharmacy. Institute of Pharmacy & Foods, University of Havana. Havana, Cuba.

²Center of Molecular Immunology. Cuba.

³Engineering: Pharmacy and Pharmaceutical Technology Area. Miguel Hernandez University. Spain.

⁴Pharmacy and Pharmaceutical Technology Area. University of Valencia, Spain.

⁵Pharmacometrics & Systems Pharmacology, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain.

Contact: gledysrf78@gmail.com

Marketed formulations ior®EPOCIM, MIRCERA® and two new branched PEGylated erythropoietin formulations (32kDa-PEG₂-rHuEPO and 40kDa-PEG₂-rHuEPO) were administered a single dose by intravenous bolus in New Zealand rabbits. The aim of this work was to develop a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model describing in a simultaneous and integrated form the time course of erythropoiesis stimulation after erythropoietin administration. The PK/PD dataset consisted of 266 EPO measurements in the pharmacokinetic analysis and 799 observations of reticulocyte (RET), erythrocyte (RBC) and hemoglobin (HGB) in the pharmacodynamic analysis from 19 and 20 rabbits, respectively.

The First Order Conditional Estimation Method with INTERACTION as implemented in NONMEM version 7.3 was used in PK/PD modeling. A semi-mechanistic cell transit model that included a two-compartment model with linear elimination and cell proliferation, maturation, and homeostatic regulation provided a good description of the data regardless the type of erythropoietin formulation administered. Inter-subject variability was associated with clearance (50%) and apparent volume of distribution of the central compartment (60%). Residual unexplained variability was estimated to be 20.5 %. The system- and drug-related parameters showed consistency and differed across formulations, respectively. The 32kDa-PEG₂-rHuEPO and 40kDa-PEG₂-rHuEPO formulations achieves a median change of 27% and 22% on RET levels, and of 63% and 47% on RBC and HGB levels, respectively compared to MIRCERA®. A semi-mechanistic PK/PD model of erythropoiesis provided an adequate description of the observed data of ior®EPOCIM, MIRCERA® and PEG-EPO 32 kDa and PEG-EPO 40 kDa in New Zealand rabbits. The administration of new branched PEG-chains formulations improves PK and PD properties, in terms of increasing el

elimination half-lives and pharmacological response on RET, RBC and HGB compared to commercially available formulations (ior[®]EPOCIM and MIRCERA[®]).

REFERENCES

1. Reynaldo G., Rodríguez L., Menéndez R., *et al.* (2018). A Comparative Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Two Novel Cuban Pegylated rHuEPO versus Mircera[®] and ior[®] EPOCIM. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 6(3), 179-190.
2. Yan, X., Lowe, P.J., Fink, M., Berghout, A., Balser, S., Krzyzanski, W. (2012). Population pharmacokinetic and pharmacodynamic model-based comparability assessment of a recombinant human Epoetin Alfa and the Biosimilar HX575. *J. Clin. Pharmacol.*, 52, 1624-1644.

Population pharmacokinetic modeling of bromopride in healthy subjects

Larissa Lachi Silva¹; Gustavo Mendes Lima Santos²; Aline B. Barth¹, Malidi Ahamadi¹, Marcos Luciano Bruschi¹; Bibiana Verlindo de Araújo³, Andréa Diniz

¹Pharmaceutical Science Graduate Program, State University of Maringa, Maringa, PR, Brazil.

²Brazilian Health Surveillance Agency, Brasilia, DF, Brazil.

³Pharmaceutical Science Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

The dopamine antagonist, Bromopride (BRO) is a prokinetic and antiemetic drug used to treat nausea and vomiting. Although its prescription is common in Brazil, there is a lack on studies of BRO pharmacokinetics. The aim of this study was to investigate the population pharmacokinetic of BRO after oral administration. This study is a retrospective analysis of data from bioequivalence studies submitted to Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). The data was modeled using MONOLIX 2018R2. Assuming one-compartment disposition and linear elimination, the oral phase was evaluated for different structural models like zero- and first-order (with and without a lag time), transit compartment and mixed absorption. Anthropometric and laboratorial results were evaluated for covariate effect. The goodness-of-fit (diagnostic plots, BIC and log-likelihood) shows model of zero order with lag time (Tlag) and combined error described better the absorption process of BRO. Inter-individual variability was considered for all parameters, although the parameter clearance (Cl) was fixed in 0.768 L/h/kg ^[1]. Typical parameters estimates were bioavailability (F) of 87%, duration of the zero-order absorption (Tk0) of 0.862 h with Tlag of 0.481 h and a volume of distribution of 4.39 L/kg. The dosage form was the covariate found to significantly

affect F and Tlag, and body mass index positively affect Tk0. Zero-order models are reasonable to describe absorption process of drugs whose input is influenced by solubility. None previous information about population pharmacokinetic absorption model was described for BRO.

REFERENCES

1. Brodie R.R. *et al.* (1986). *Biopharm. Drug Dispos.*, 7, 215-222.

Bioavailability prediction for losartan tablets by means of PBPK modeling and simulation

Alejandra Schiavo, Manuel Ibarra, Pietro Fagiolino.

Department of Pharmaceutical Sciences, School of Chemistry. Universidad de la República,
Center of Bioavailability and Bioequivalence for Medicine Evaluation (CEBIOBE)

The Uruguayan pharmaceutical market is composed in a large percentage of similar medicines, a situation that is common to other countries in Latin America. This factor adds variability to the PK/PD outcome in the clinical setting, both at the onset of a therapy and when products are interchanged throughout chronic treatments. In this context, development of physiologically-based pharmacokinetic models (PBPK) integrating biorelevant in vitro drug dissolution can be employed to detect possible bioinequivalence issues. Here, a PBPK model for losartan and its active metabolite, carboxylosartan, was developed to predict the performance of different multi-source products. PK-Sim® (Bayer) software was employed for modeling and simulation. The model was evaluated by comparing in silico outputs for plasma concentration-time profiles of the parent drug and the metabolite with published data for the brand-name drug Cozaar® in two stages: (i) integrating losartan and carboxylosartan physicochemical and pharmacokinetic properties to predict in vivo dispositions after an intravenous administration of them; (ii) integrating in vitro biorelevant dissolution to predict losartan bioavailability and in vivo formation of carboxylosartan from losartan. For the stage (ii) different in vitro conditions were assessed. Finally, a suitable in vitro-in silico-in vivo correlation was achieved by using data from dissolution testing in USP Apparatus II at 75 RPM in acidic (HCl/KCl pH 1.2, 37°C, 30 min) and neutral (Phosphate buffer pH 6.8, 37°C, 10 min) conditions and simulating a two- phase dissolution for the formulation input at the PBPK model. Secondary pharmacokinetic parameters for a virtual Caucasian population of healthy subjects (50:50 male:female) assessing rate and extent of absorbed drug, as well as drug disposition were simulated with acceptable mean absolute error. The validated model was finally used for extrapolation of losartan and carboxylosartan pharmacokinetics for the similar products.

Results indicate that no significant differences for losartan bioavailability are foreseen between marketed brands.

REFERENCES

1. Lo M., Goldberg M., McCrea J., Lu H., Furtek C., Bjornsson T. (1995). Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. DOI 10.1016/0009-9236(95)90020-9
2. Nguyen H., Lin J., Kimoto E., Callegari E., Tse S., Obach R. (2017). Prediction of Losartan-Active Carboxylic Acid Metabolite Exposure Following Losartan Administration Using Static and Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. DOI 10.1016/j.xphs.2017.03.032.

Population pharmacokinetic analysis of PHT in epileptic patients after the oral administration of two formulations marketed in Uruguay

Marianela Lorier, Manuel Ibarra, Natalia Guevara, Cecilia Maldonado, Marta Vázquez and Pietro Fagiolino¹

Department of Pharmaceutical Sciences, School of Chemistry. Center of Bioavailability and Bioequivalence for Medicine Evaluation (CEBIOBE). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Phenytoin (PHT) is a widely prescribed antiepileptic drug used to treat several types of seizures. PHT characterizes for a non-linear pharmacokinetic, narrow therapeutic range and acute dose-related side effects. Also, PHT induces efflux transporters in a dose-dependent manner.

The aim of the present investigation was to compare the oral bioavailability of two products containing PHT marketed in Uruguay (Comitoína simple[®] and Antepil[®]). Data from a previously conducted pharmacovigilance study was modeled. A total of 57 patients (30 female, 27 male) between 18 and 76 years old with epilepsy and under chronic treatment with either one of the mentioned formulations, were enrolled in the study. Age, weight, albumin concentrations, clinical outcome and adverse effects information was collected. The protocol was approved by the Institutional Ethics Review Committee of the Faculty of Chemistry.

Morning steady state pre-dose blood and saliva samples were collected every 3 months. At least 6 extra saliva samples were withdrawn at the first 12 hours post dose.

A one-compartment pharmacokinetic model with nonlinear elimination was implemented to describe plasma PHT concentrations. A Maximum a Posterior estimation for the population parameters was employed in MONOLIX 2018. Covariates analysis was performed.

Body weight was included as a covariate in volume of distribution (V1) and maximum elimination rate (Vm). Interestingly, a correlation between Saliva/Plasma ratio and PHT plasma concentration was found. Considering albumin concentrations were within the normal range for all patients, no protein saturation may be envisaged. Then, the correlation found could not be due to a concentration-dependent PHT protein binding and would evidence the induction of efflux transporters at the salivary glands.

Lastly, no difference was found between the oral bioavailability of the studied formulations.

Population Pharmacokinetic Modeling of Tacrolimus in Pediatric and Adult Renal Transplant Patients

Lorena Ivette Medina-Aymerych¹, Jose Rodrigo Gonzalez-Ramirez¹, Mara Medeiros- Domingo², Francisco Flores-Murrieta, Gilberto Castañeda-Hernandez

¹Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

²Unidad de Investigación y de Diagnóstico en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México.

³Unidad de Investigación en Farmacología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México.

Tacrolimus is a potent immunosuppressive drug widely used in adults and children for the prevention of allograft rejection after kidney transplantation [1,2]. However, because of tacrolimus narrow therapeutic index and high inter-individual pharmacokinetic (PK) variability [3,4], blood concentrations must be monitored. Population PK modeling could be a useful tool in the tacrolimus therapeutic drug monitoring (TDM). Therefore, a popPK model was developed in pediatric (n=29) and adult (n=60) kidney-transplant recipients using Phoenix NLME 8.0 version with the FOCE ELS algorithm selected as the estimation method. Some tacrolimus PK variability factors were assessed with the stepwise forward inclusion procedure. The minimum value of twice the negative log likelihood (-2LL) and the goodness of fit graphs were used to choose suitable models. The final model was internally validated. During the PK model-building procedure, different structural pharmacokinetic models were tested. The tacrolimus PK profiles were best described by a two-compartment model with first order absorption and elimination. Additionally, intra-patient variability (IPV) was modeled with an additive error. Our covariate analysis detected significant effect

of age, weight, and hematocrit, being the age, the most significant covariate tested. In conclusion, a population pharmacokinetic model of tacrolimus was developed and validated in both, pediatric and adult patients with renal transplant. The final model is expected to improve clinical outcomes during the TDM of tacrolimus. This study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Boards and Ethics Committees.

Keywords: Tacrolimus – population pharmacokinetic – therapeutic drug monitoring

REFERENCES

1. Halloran P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 351(26):2715-2729.
2. Samaniego M., Becker B.N., Djamali A. (2006). Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Nature Clinical Practice. Nephrology*, 2(12):688-699.
3. Venkataramanan R., Swaminathan A., Prasad T., *et al.* (1995). Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics*, 29(6):404-430.
4. Antignac M., Barrou B., Farinotti R., Lechat P., Urien S. (2007). Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64(6):750-757.

POSTERS PRESENTATIONS

Modeling & simulation of amikacin in pediatric cystic fibrosis for dose optimization

Paulo Caceres Guido^{1,2}, Manuel Ibarra³, Mariel Perez², Alicia Halac², Mariela Ferrari², Nieves Licciardone², Claudio Castaños², Luis Pablo Gravina², Cristina Jimenez², Facundo Garcia Bournissen^{4,5}, Paula Schaiquevich^{1,5}

¹Clinical Pharmacokinetics Unit, Hospital de Pediatría JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

²Pharmacy, Ward-CIM 73, Laboratory, Molecular Biology-Genetics, and Pulmonology Department Hospital de Pediatría JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

³Pharmaceutical Sciences Department, Faculty of Chemistry-Universidad de la República, Uruguay.

⁴Parasitology and Chagas Service - Hospital General de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina.

⁵National Scientific and Technical Research Council (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Amikacin is a valid option to treat lung chronic infection in pediatric patients with cystic fibrosis (CF). The efficacy is related to the achievement of a high C_{max}/MIC (maximum plasma concentration/minimum inhibitory concentration) ratio: 8 to 10. However, pharmacokinetic data in this population are very scarce. The objective of this study was to develop a population pharmacokinetic model describing amikacin disposition in pediatric CF patients. A prospective study was carried out after protocol and informed consent approval by the Institutional Review Board at Garrahan Pediatric. Patients less than 18 years old, with CF diagnosis and receiving amikacin for treatment of lung infections were eligible. Serum samples derived from therapeutic drug monitoring.

Thirty-nine patients were included (114 amikacin concentrations). A population pharmacokinetic model was developed using MONOLIX Suite-2018R1 (Lixoft). Final population estimates for the elimination rate constant (k) and the volume of distribution (V) were 0.541 h^{-1} and 0.451 L/kg , respectively. Between-subject and between-occasion variability were 53% and 16.5% for k and 31% and 22% for V , respectively. Body-weight remained as a significant covariate associated with V . Simulations allowed prediction and evaluation of C_{max} and C_{trough} distributions for different dosage regimes with clinical implications. Based on our analysis, 67% of the simulated patients receiving 30 mg/kg/day , could achieve an appropriate C_{max}/MIC . Although all our patients had good clinical results and a very good adverse events profile, further studies are necessary to redefine an optimal therapeutic strategy.

Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in patients with lupus nephritis

Melissa Romano Aguilar¹; Susanna Edith Medellín Garibay¹; Rosa del Carmen Milán Segovia¹; Marco Ulises Martínez²; Silvia Romano Moreno

¹Laboratorio de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

²Servicio de Reumatología del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" (HCIMP), San Luis Potosí, México.

Lupus nephritis (LN) is the most frequent severe complication of systemic lupus erythematosus and is associated with increased morbidity and mortality [1]. Mycophenolate mofetil (MMF) is the prodrug of mycophenolic acid (MPA) a potent immunosuppressant agent that provides effective treatment for LN patients [2-3].

The aim of this study was to analyze the pharmacokinetic behavior of MPA and estimate the dosing requirements in Mexican patients with LN using nonlinear mixed effects modelling (NONMEM®).

The study enrolled 40 patients receiving MMF with LN from HCIMP of San Luis Potosí. Samples were collected pre-dose, 0.3, 0.6, 1, 1.5, 2, 4 and 6 hours post-dose.

MPA concentrations were determined by an UPLC-MS/MS technique. Patients were genotyped for enzymes UGT1A8, 1A9, 2B7 and transporters ABCC2 and SLCO1B3.

A two-compartment model with first order absorption and elimination best described the data. The final population pharmacokinetic model obtained was: $CL(L/h)=15.4*(CrCl/80)^{0.633}*(1+0.583PDN)$; $Vc(L)=0.38*BW$, $Ka(h^{-1})=1.28$, $Q(L/h)=15.4$, $Vp(L)=755$. (CrCl: creatinine clearance; PDN: prednisone; BW: body weight). Apparent clearance of MPA decreased with reducing renal function. Patients with decreased CrCl have a reduced hepatic metabolism generated by the chronic renal failure state itself [4]. PDN comedication showed an increase in the CL of MPA, possibly through induction of UGT [1,5]. The only covariate that demonstrated influence in Vc was BW. The internal validation of the model obtained for MPA was performed by the Bootstrap and the visual predictive check techniques. Stochastic simulations were executed to propose dosing guidelines considering CrCl, BW and PDN comedication to achieve expected MPA AUC_{0-12 h} (30-60 $\mu g \cdot h/L$).

Ethical approval

The protocol of this study was approved by The Ethics Committee in Research of the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (No.71-17) and the Research and Teaching Ethics Committee of the Faculty of Chemical Sciences of the Autonomous University of San Luis Potosí (No. CEID2017113-S). Each patient provided written informed consent prior to study enrolment.

Financial support

This project was supported by Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí with reference number C18-FAI-05-62.62.

REFERENCES

1. Mino Y., Naito T., Matsushita T., Otsuka A., Ushiyama T., Ozono S., Hishida A., Kagawa Y. and Kawakami J. (2008). Comparison of pharmacokinetics of mycophenolic acid and its glucuronide between patients with lupus nephritis and with kidney transplantation. *Ther Drug Monit* 30(6): 656-661.
2. Sherwin C.M., Fukuda T., Brunner H.I., Goebel J. and Vinks A. A. (2011). The evolution of population pharmacokinetic models to describe the enterohepatic recycling of mycophenolic acid in solid organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Pharmacokinet* 50(1): 1-24.

3. Abd Rahman A.N., Tett S. E., Abdul Gafor H.A., McWhinney B.C. and Staatz C.E. (2017). Development of Improved Dosing Regimens for Mycophenolate Mofetil Based on Population Pharmacokinetic Analyses in Adults with Lupus Nephritis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 42(6): 993-1004.
4. Joy M.S., Hilliard T., Hu Y., Hogan S.L., Dooley M.A., Falk R.J. and Smith P.C. (2009). Pharmacokinetics of mycophenolic acid in patients with lupus nephritis. *Pharmacotherapy* 29(1): 7-16.
5. Cattaneo D., Perico N., Gaspari F., Gotti E. and Remuzzi G. (2002). Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int* 62(3): 1060-1067.

Determination of mycophenolic acid and pharmacokinetic application in kidney transplant patients

Juan Eduardo Reséndiz Galván¹, Susanna Edith Medellín Garibay¹, Rosa del Carmen Milán Segovia¹,
Javier Isordia Segovia², Silvia Romano Moreno¹

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

²Unidad de Trasplantes. Hospital Central Dr. "Ignacio Morones Prieto".

Mycophenolic acid (MPA) is an antimetabolite immunosuppressant of choice in solid organ transplant regimens [1]. Mycophenolate of mofetil is a pro-drug and after oral administration, it is completely absorbed and readily hydrolyzed to its active metabolite MPA. The pharmacokinetics of MPA is characterized by large inter- and intraindividual variability [2]. A chromatographic method (UPLC-MS/MS, Waters Corporation) was standardized and validated according to national. Pharmacokinetic parameters of MPA were calculated using WinNonlin[®] software (v. 4.2) by non-compartmental analysis. Optimal conditions for UPLC-MS/MS method were obtained with ESI (+). Selected transitions correspond to m/z 321.07→159.0 and 321.07→207.0 for qualification and quantification of MPA. Indomethacin was used as internal standard. The method was validated according to NOM177-SSA1-2013. Calibration curves were linear at 0.2 – 30 µg/mL of MPA in plasma ($r^2 > 0.996$) with recoveries between 90 and 110%. Inter and intra- assay precision were 2.98% and 3.4% of coefficient of variation (<5%). The implemented and validated technique was used to quantify MPA in 10 concentration- time profiles (0 – 12 h) from 10 kidney transplant patients. Mean AUC was 40.6 ± 17 L/h, C_{max} 11.9 ± 5 µg/mL, CL of 15.57 ± 9 L/h, V 104.3 ± 48 L. This study represents an advantage on therapeutic drug monitoring of this immunosuppressant in kidney transplant patients to support pharmacological treatment.

REFERENCES

1. Staatz C.E. and Tett S.E. (2007). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinetic* 46(1):13-58.
2. Betônico G. *et al.* (2008). Pharmacogenetics of mycophenolate mofetil: a promising different approach to tailoring immunosuppression? *J Nephrol* 21:503-509

Pharmacokinetics and pharmacogenetics of lamotrigine in adult patients with epilepsy

Cinthya Eloisa Chávez Castillo¹, Susanna Edith Medellín Garibay¹, Rosa del Carmen Milán Segovia¹, Ildefonso Rodríguez Leyva², Silvia Romano Moreno¹

¹Pharmacy Department, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous San Luis Potosí University, San Luis Potosí, México.

²Epilepsy Clinic of the Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí, México.

Lamotrigine (LTG) is a second-generation anti-epileptic drug (AED) that has been widely used for focal and generalized seizures in adults and children as monotherapy or in combination with other AEDs [1-3]. The aim of this study was to develop a population pharmacokinetic model for quantitative evaluation of the influence of various demographic, pathophysiological, genetic variants and adjunctive therapy on LTG pharmacokinetics.

A total of 73 adult patients on stable treatment with LTG at least two weeks as mono or adjunctive therapy attended at the Epilepsy Clinic of the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” were included. LTG was determined by HPLC-UV technique in one plasma sample per patient. Population pharmacokinetics analysis was performed by non-linear mixed effects modelling approach using NONMEM® software. The covariables tested were: age, sex, height, weight, serum albumin, creatinine, alanine transaminase, and aspartate aminotransferase levels, creatinine clearance, body mass index, body surface, tobacco consumption, UGT2B7 genetic variants, comorbidities and adjunctive therapy.

Absorption rate constant, bioavailability and distribution volume were fixed at 1.4 h^{-1} , 1.00 and 1.8 L/kg , respectively, to stabilize the model. LTG clearance was estimated at 1.82 Lh^{-1} and was associated with co-treatment with valproic acid (VPA) and carbamazepine (CBZ). The final population pharmacokinetic model for LTG was $CL\text{ (L/h)} = 1.82 \times (1 - 0.465\text{ VPA}) \times (1 + 0.841\text{ CBZ})$ and it explains 23% of the interindividual variability associated with LTG clearance. This model was internally validated by

bootstrap and visual predictive check techniques. Stochastic simulations were performed to propose dosage regimens considering comedication with VPA and CBZ to achieve reference interval (2.5 – 15 mg/L).

This is the first population pharmacokinetic study of LTG in Mexican patients and indicates that co-treatment with VPA and CBZ should be considered to individualize epilepsy treatment with this drug.

Ethical approval

The study was approved by Research Ethics Committee and the Research Committee of the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (registration number 70-17) and under the knowledge of the Committee of Ethics in Research and Teaching of the Faculty of Chemical Sciences (code of registration: CEID2017112-S).

REFERENCES

1. Milosheska D., Lorber B., Vovk T., Kastelic M., Dolžan V. and Grabnar I. (2016). Pharmacokinetics of lamotrigine and its metabolite N-2-glucuronide: Influence of polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(2), 399-411.
2. Mallaysamy S., Johnson M., Rao P., Rajakannan T., Bathala L., Arumugam K., van Hasselt J. and Ramakrishna D. (2012). Population pharmacokinetics of lamotrigine in Indian epileptic patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 69(1), 43-52.
3. Rivas N., Buelga D., Elger C., Santos-Borbujo J., Otero M., Domínguez-Gil A. and García M. (2008). Population Pharmacokinetics of Lamotrigine with Data from Therapeutic Drug Monitoring in German and Spanish Patients with Epilepsy. *Therapeutic Drug Monitoring*, 30(4), 483-489.

Bioanalytical method validation for the simultaneous determination of paracetamol, amantadine and chlorpheniramine in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Erick Gerardo Espinosa-Cuara^{1,2}, María Cristina Martínez-García¹, Erika Sosa-Martínez¹, María Elena Velázquez-Hernández¹, Norma Lugo-Santos, Christian Estrada-Bernal, José Herrera-Rodríguez¹

¹Bioanalytical Department. Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, México.

²Master in Clinical Research Student. CECYPE-CIATEJ, México.

Paracetamol, amandatine and chlorpheniramine are used as a combination in the treatment of common cold. "This combination is one of the most popular over the counter analgesic and antipyretic drugs which is available in different dosage forms" [1]. A rapid, sensitive and specific high performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry method was developed and validated to simultaneously determine paracetamol, amantadine and chlorpheniramine, using diphenhydramine and memantine as internal standards. Following a liquid-liquid extraction with ether:dichloromethane:hexane:isopropanol, the analytes were separated using a ZORBAX ECLIPSE XDB-CN 4.6X75 mm, 3.5 μ m column, with a composition of formic acid 1% in acetonitrile: Ammonium acetate 10 mM in formic acid 1% (80:20 v/v) used as mobile phase, and analyzed by positive electrospray ionization tandem mass spectrometry (Agilent HPLC- MS/MS Triple Quadrupole). Multiple Reaction Monitoring (MRM) was used with the precursor to product ion transitions of m/z 152.1 $\rightarrow$ 110.0 (Paracetamol), 152.1 $\rightarrow$ 135.1 (Amandatine), 275.1 $\rightarrow$ 230.0 (Chlorpheniramine), 180.1 $\rightarrow$ 107.05 (Memantine) and 256.1 $\rightarrow$ 167.05 (Diphenhydramine). The method was linear in the range of 50.0-10000.0 ng/mL for paracetamol, 2.0-700.0 ng/mL for amantadine and 0.1-10.0 ng/mL for chlorpheniramine ($r^2 > 0.99$). Precision was less than 15% (%CV) and accuracy was less than 15% (%RE) for the three analytes. The method was fully validated according to the Mexican guidance NOM-177-SSA1-2013 [2] and applied in a bioequivalence study of Paracetamol/Amantadine/Chlorpheniramine following a single oral dose of (300 mg/50 mg/3 mg) capsules in 20 healthy volunteers (COFEPRIS approved, 163300410B0447/2016).

REFERENCES

1. Feng *et al.* (2009). Rapid Simultaneous Determination of Paracetamol, Amantadine Hydrochloride, Caffeine and Chlorpheniramine Maleate in Human Plasma by liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. *Drug Research Journal*.
2. Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-2013.

Therapeutic drug monitoring of levetiracetam in patients with epilepsy

María Patricia Hernández Mitre¹, Frida Sofía Boer Pérez², Ildefonso Rodríguez Leyva³, Herlinda Castillo Ibarra³, Susanna Edith Medellín Garibay², Silvia Romano Moreno², Sergio Zarazúa Guzman², Helgi Helene Jung Cook⁴, Rosa del Carmen Milán Segovia²

¹Estudiante de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la FCQ-UASLP.

²Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

³Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, S.L.P.

⁴Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.

Therapeutic Drug Monitoring (TDM) of levetiracetam (LEV) allows to evaluate therapeutic adherence and determine the impact of interchangeability of innovative LEV by generic products, as it may result in loss of seizure control or pharmacological toxicity. This is achieved through the plasma LEV quantification in patients with epilepsy (PWE). The study was approved by the Hospital's Research Ethics Committee (No. 86-16) and participants signed informed consent. Patients ≥ 18 years were required to be on stable dose treatment with immediate-release LEV for at least 1 week, in monotherapy or polytherapy with another antiepileptics. From each patient, 1 to 4 samples of blood were obtained at different times in the range from 0 to 12h post-dose. Samples were analyzed by a validated HPLC-UV method. Innovative and generic products of LEV available in the market were identified. LEV plasma concentrations of 110 PWE were determined. Pharmacokinetic parameters $C_{max}=26.16\mu\text{g/mL}$ (500mg dose-normalized) and $T_{max}=1.37\text{h}$ were calculated using non-compartmental analysis (NCA) with WinNonlin® Professional Version 4.1. Median elimination half-time ($t_{1/2}$) was 5.81h (5.1 to 6.7h) for patients ≤ 60 years and 8.97h (7.74 to 10.92h) for elderly patients, which is greater due to age-associated decreased renal function. Results are in accordance with previous reports [1]. Only 48.48% of the patients had plasma concentrations within the therapeutic range (6 to $46\mu\text{g/mL}$), and 34.55% of patients may require dose reduction, while 17.27% may need dose increase. We identified 18 generic products and only 10% of the patients acquire the innovative product. No correlation was found between reached C_{max} and innovative or generic products administration. TDM of LEV in PWE has been successfully implemented as a clinically useful tool to protect patient's quality of life.

REFERENCES

1. Patsalos, P.N. (2000). Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacol Ther.*, (85):77-85.

Therapeutic drug monitoring of isoniazid and rifampicin and genotyping analysis in patients with tuberculosis

Espiricueta-Zavala Luz Alejandra¹; Rodríguez-Baez Ana Socorro¹; Huerta-García Apa Patricia¹; Rodríguez-Pinal Cristian Jazmín¹; Ortiz-Álvarez Arturo²; Romano Moreno Silvia; Medellín-Garibay Susanna Edith¹; Milán-Segovia Rosa del Carmen¹

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

²Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, SLP.

*Master's student in Ciencias Farmacobiológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Email: luxzavala@icloud.com Phone number: 4443143900.

Strictly supervised shortened treatment (DOTs) for tuberculosis includes isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide and ethambutol. One strategy to improve the response to treatment is the individualization of doses through the plasma monitoring of antimicrobial concentrations. Prospective, analytical, observational and cross-sectional study was approved by ethics committee, number 77-15. 43 patients with TB under DOTs scheme were included. Samples of venous blood were taken at 2 and 4 hours post-dose. Genotyping analysis was carried out for *NAT2* and *MDR1* genes; anthropometric, clinical and medication data recorded. The quantification of RIF and INH was made using a validated UPLC-MS/MS method. Genotyping of *NAT2* showed 51.16% slow acetylators, 34.88% intermediate and 13.95% fast. The *NAT2* rapid phenotype showed significant differences ($p < 0.05$) with $t_{1/2}$ (2.72h), C_{max} (3.25 µg/mL), $ABC_{0,\infty}$ (11.45h*/g/mL), λ (0.28h⁻¹) and CL/F (26.23L/h) compared to the slow acetylator, with $t_{1/2}$ (4.7h), C_{max} (5.16 µg/mL), $AUC_{0,\infty}$ (22.35h*/g/mL), λ (0.16h⁻¹) and CL/F (13.8L/h). The therapeutic interval reported for INH is 3-5 µg/mL, therefore, 32.56% of patients were identified below and 32.56% above it.

The homozygous polymorphic TT patients of *MDR1* registered increased values of K_a , C_{max} and $ABC_{0,\infty}$, and lower $t_{1/2}$ and T_{max} compared to other genotypes. Among wild subjects CC and heterozygous CT, significant differences were recorded in K_a , $t_{1/2}$, C_{max} , T_{max} and $ABC_{0,\infty}$, respectively. Therapeutic range of rifampicin ranges from 8-24 µg/mL: 18.18% of patients were below and 81.81% had bactericidal concentrations.

REFERENCES

1. Goutelle S., *et al.*, (2017). Individualizing tuberculosis therapy. En R. Jelliffe, & M. N., *Individualized Drug Therapy for Patients* (pp. 239-250). Los Angeles, California: Elsevier.

Application of method by UPLC-MS/MS for quantification of methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis

Ana Socorro Rodríguez Báez^{*1}, Ana Patricia Huerta García¹, Carlos Abud Mendoza², Marco Martínez Martínez², Cristian Jazmín Rodríguez Pinal¹, Silvia Romano Moreno¹, Susanna Edith Medellín Garibay¹, Rosa del Carmen Milán Segovia¹.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

²Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto".

*Estudiante de Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Methotrexate (MTX) is one of the most commonly prescribed drugs for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). The therapeutic effects are due to intracellular transport and its transformation to polyglutamates (MTX-PGs) [1]. The products of glutamination can be 2- 6 molecules of PGs; the prevalent type of PG species is PG3 associated with the efficacy and PG5 is associated with the presence of side effects.

Red blood samples were analyzed by UPLC-MS/MS using a HSS T3 column with a mobile phase 10 mM ammonium bicarbonate (pH 7.5) and a flow rate of 0.3 mL/min. The analysis consisted of simple sample preparation and run time of 8min. Detection was done using a Waters Acquity UPLC with a Waters Quattro Premier XE with electrospray ionization operating in the positive ionization mode.

The method was linear from 1.9-500nM for PG3 and 3.9-500nM for PG5 ($R^2 > 0.99$). It is accurate, selective and precise (reproducibility and repeatability with a CV < 15%) complying with the provisions of NOM-177-SSA1-2013. Samples were stable for at least 1 month at -80°C. Fifty-nine patient samples were analyzed obtaining average concentrations of 20.53nM and 1.8nM of PG3 and PG5, respectively.

The developed of this method allows the quantification of MTX-PGs in red blood cells, which can be applied in clinical studies such as pharmacokinetic evaluations or therapeutic drug monitoring in patients with RA.

REFERENCES

1. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. (2016). Folyl polyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*, 6:356.

Quantification of loperamide in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry

María Cristina Martínez-García¹, Erick Gerardo Espinosa-Cuara¹, José Herrera- Rodríguez¹, Jourdan Jesus Carrillo-Pañaloza¹, Sergio Pérez-Gutiérrez¹, Ángel Maciel- Ávalos¹, María Elena Velázquez-Hernández¹

¹Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C.

*Corresponding author

Loperamide is a potent μ -opioid receptor agonist with antidiarrheal action [1]. Reported analytical methods for plasma determination of loperamide are complex or have poor sensitivity [2,3]. A method based on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC- MS/MS) has been developed and validated for the quantitative determination of loperamide in human plasma. Ethyl acetate-hexane (80:20 v/v) was used to extract loperamide and eletriptan (internal standard) from an alkalized plasma sample. The LC separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH HILIC (3.0 x 75 mm, 1.7 μ m) column using formic acid 0.1% in methanol: formic acid 0.1 % in water (60:40 v/v) as mobile phase, with a run time of 1.5 min at a constant flow rate of 0.5 mL/min. The retention time of loperamide and eletriptan were 0.73 and 0.74 minutes, respectively. The MS/MS ion transition monitored (MRM) were m/z 477.34 $\rightarrow$ 266.10 for loperamide and 383.22 $\rightarrow$ 84.30 for eletriptan. The calibration curve was linear through the range of 20 – 5 000 pg/mL ($r = 0.999492$). The within- and between-day precisions were all below 8.9% (CV) and accuracies below 8.8% (RE). The short term (24 h at room temperature) and long-term stability (15 days at freezing) were demonstrated. The method also showed acceptable specificity, sensibility, recovery (loperamide 83.8% and eletriptan 87.5%) and did not showed carry over or matrix effect. A simple, fast, and sensitive LC-MS/MS method for the quantification of loperamide in human plasma was validated according to Mexican regulation and was successfully used in a clinical study of pharmacokinetic bioequivalence [4].

REFERENCES

1. Arafat, *et al.* (2014) *Journal of Chromatography B*, 972, 81-88
2. Yu, *et al.* (2004) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 421-427
3. He, *et al.* (2000) *Journal of Chromatography B*, 744, 323-331
4. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

Correspondence between the CYP2C19 and CYP3A4 genotypes with the inferred metabolizer phenotype by omeprazole administration in Mexican healthy children

Alma Faviola Favela Mendoza¹, Gabriela Martínez Cortes¹, Marina María de Jesús Romero Prado², Elba Margarita Romero Tejeda³, María Cristina Islas Carbajal⁴, Martha Sosa Macías⁵, Ismael Lares Asseff⁵, Héctor Rangel Villalobos¹

¹Centro Universitario de la Ciénega, Instituto de Investigación en Genética Molecular, Universidad de Guadalajara, Ocotlán, México.

²Centro Universitario de Ciencias de Salud, Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

³Laboratorio de Investigación y Desarrollo Farmacéutico, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

⁴Centro Universitario de Ciencias de Salud, Unidad de Investigación Cardiovascular, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

⁵Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del IPN CIIDIR-IPN, Unidad Durango, Durango, México.

CYP2C19 genotypes presumably allow predicting the metabolizer phenotypes: poor (PMs), extensive (EMs) and ultra-rapid (UMs). However, evidence from previous studies regarding this predictive power is unclear, which is important because the benefits expected by health care institutions and patients are supported on this premise [1-10]. Therefore, we aimed to complete a formal evaluation of the diagnostic value of the *CYP2C19* and *CYP3A4* genes to predict metabolizer phenotypes established by omeprazole administration in 118 healthy children from Jalisco (West, Mexico). The genotypes for *CYP3A4**1B and *CYP2C19**2, *3, *4, *5 and *17 alleles were determined. The CYP2C19 and CYP3A4 phenotypes were obtained after 20 mg omeprazole administration and HPLC quantification in plasma to estimate the Hydroxylation index (HI= OME/HOME) and Sulfonation index (SI= OME/SOME), respectively. The *CYP2C19* and *CYP3A4* genotype and phenotype distribution was similar to previous studies in Mexico and Latin America. Although differences in the HI distribution were observed between *CYP2C19* genotypes, they showed a poor diagnostic ability for predicting the CYP2C19 metabolizer phenotype. Similarly, the number of *CYP2C19* and *CYP3A4* functional alleles was correlated to the HI distribution, but also their diagnostic ability was poor to predict the CYP2C19 phenotype. In conclusion the CYP2C19 phenotype is not predicted by the number of functional alleles of the *CYP2C19* and *CYP3A4* genes. Phenotyping is still the most valuable alternative to dose individualization for CYP2C19 substrate drugs.

REFERENCES

1. Shirasaka Y., et al. (2013). *Drug Metab. Dispos.*, 41(7):1414-24. doi:10.1124/dmd.113.051722.

2. Isaza C, *et al.* (2007). *BMC Clin. Pharmacol.*, 7:6. doi:10.1186/1472-6904-7-6.
3. Payan, M., *et al.* (2014). *DARU J. Pharm. Sci.*, 22: 81. <https://doi.org/10.1186/s40199-014-0081-6>.
4. Linden R., *et al.* (2009). *Braz. J. Pharm. Sci.* 45: 461-67.
5. Kearns G.L., *et al.* (2010). *Drug Metab. Dispos.*, 38(6): 894-97. doi:10.1124/dmd.109.030601.
6. Li-Wan-Po A. *et al.* (2010). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 69(3): 222-30. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03578.x
7. González H.M., *et al.* (2003). *J. Clin. Pharmacol.*, 43:1211-1215.
8. Favela-Mendoza A.F., *et al.* (2015). *J. Genet.*, 94: 3. <https://doi.org/10.1007/s12041-015-0477-1>
9. Ward R.M., Kearns G.L. (2013). Protom Pump Inhibitors in Pediatrics. *Pediatr Drugs*, 15:119-131.
10. De Bock L., *et al.* (2013). *Drug Metab. Dispos.*, 41(2): 390-397.

Nonlinear pharmacokinetics in rats of a galloylquinic acid isolated from *Copaifera langsdorffii*

Juliana de Carvalho da Costa¹, Erick Vicente da Silva Motta¹, Fabiano Barreto², Bibiana Verlindo de Araujo², Jairo Kenupp Bastos¹

¹Department of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Café, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Copaifera langsdorffii is a large tree popularly known as “copaiba” and distributed in many Brazilian states [1]. This plant species leaf extracts and isolated compounds display gastroprotective and antilithiatic activities. In previous works, *C. langsdorffii* extract demonstrated to be potent on the treatment and prevention of kidney stones in rats [2,3]. In order to investigate the influence of this species against urolithiasis, it was observed that polar fractions were more active and 5',5"-di- O-methyl-3,4-di-O-galloylquinic acid was isolated and studied pharmacokinetically. Therefore, the aims of this study were to determine plasmatic and kidney concentrations of this galloylquinic acid and modeling the results obtained. Three groups of five healthy male Wistar rats (Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul number 29547) were anesthetized and blood samples were collected at 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min. after i.v. administration of 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg and 2.0 mg/kg of galloylquinic acid. A tissue distribution assay was also performed, in which three animal per time had blood and kidney

collected at 5, 15, 45, 60, 90, 120 and 180 min. after i.v. administration of 1.0 mg/kg of galloylquinic acid. The pharmacokinetic parameters were analyzed using Phoenix[®] for non-compartmental analysis and Scientist[®] for two-compartmental analysis with Michaelis-Menten elimination. The AUC_{0-inf} values were 113.1±26.0 vs 103.8±23.9; 289.7±81.7 vs 386.1±151.0; 386.1±151.0 vs 363.6±142.3 (ng*h/mL), respectively for non- compartmental and compartmental analyses of 1.0; 1.5 and 2.0 mg/mL. With regard to the kidney parameters, it was found an AUC_{0-t} of 1.24 µg*h/mL, resulting in a tissue/plasma ratio of 12.4. In conclusion, it was demonstrated that this galloylquinic acid has a nonlinear profile, being described better with Michaelis-Menten elimination. It has also affinity to kidneys, where a high concentration was found.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, urolithiasis, galloylquinic acid, pharmacokinetic, modeling.

Acknowledgements: FAPESP to financial support (Project #2012/03852-5).

REFERENCES

1. Sousa J.P.B., Brancalion A.P.S., Souza A.B., Turatti I.C.C., Ambrósio S.R., Furtado N.A.J.C., Lopes N.P., Bastos J.K. (2011). Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 54: 653-659.
2. Brancalion A.P.S., Oliveira R.B., Sousa J.P.B., Groppo M., Berreta A.A. Barros M.E., Boim M.A., Bastos J.K. (2012). Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. *Urol. Res.*, 40: 475-481.
3. Oliveira R.B., Coelho E.B., Rodrigues M.R., Costa-Machado A.R.M., Sousa J.P.B., Berretta A.A., Bastos J.K. (2013). Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* doi: 10.1155/2013/131372.

Betacyanins from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits against acetaminophen-induced oxidative liver damage

Herson Antonio González-Ponce¹, Ma. Consolación Martínez-Saldaña², Manon Buist- Homan³,
Klass Nico Faber , Han Moshage³

¹Doctorate in Engineering Sciences, Postgraduate Department, Instituto Tecnológico de Aguascalientes.

²Department of Morphology, Basic Sciences Centre, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

³Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen.

Acetaminophen (APAP) represent a worldwide health problem due to the risk of morbidity and mortality by its misuse [1,2]. Overdoses of acetaminophen induce acute liver injury caused by an electrophilic metabolite [3]. Plant-based medicine has been used for centuries against human diseases due to presence of biocomponents with pharmacological activities [4]. The aim of this study was to identify the main component and to evaluate the therapeutic effect of two purple cactus fruits against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Juices were obtained by peeling and squeezing each type of cactus fruit, then lyophilized, stored, and characterized. Male Wistar rats were used to evaluate the effect of the treatments (800 mg/kg, *p.o.*) used 0.5 h after acetaminophen-induced acute liver injury (500 mg/kg, *i.p.*). Biochemical and molecular (qPCR) tests were analyzed after 6 h, and histological tests after 24 h of APAP intoxication. Results showed that betacyanin pigments are the main components in the analyzed *Opuntia* fruits. Treatments were effective by modulating the main biochemical (ALT, AST, LDH, ALP, GSH, and MDA) and molecular (Mn-SOD, HO-1, GCL, and Gadd45 β) markers of liver damage, both *in vivo* and *in vitro*. The histological and cell culture tests showed a reduction of cell death and swelling of the hepatocytes exposed to acetaminophen and treated with *Opuntia* fruit juices. The presence of betalains, specifically betacyanins, in *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* might be the cause of the improvement of the liver function due to their capacity to inactivate free radicals [5] and modulate molecular responses of detoxification [6] and survival [7] after the acetaminophen intoxication. Results suggest that betacyanins in *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits might be used as an alternative treatment against APAP-induced acute liver damage although further studies to determine their bioavailability and therapeutic dosage of the isolated compound are needed to confirm this.

Abbreviations: APAP: acetaminophen; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase; ALP: alkaline phosphatase; GSH: glutathione; MDA: malondialdehyde; Mn-SOD: manganese-superoxide dismutase; HO-1: heme-oxygenase 1; GCL: glutamate-cysteine ligase; Gadd45 β : growth arrest and DNA damage-inducible beta.

Ethical approval: experiments were approved by and performed following the guidelines of the local Committee for Care and Use of laboratory animals (Permission No. 6415A of the Committee for Care and Use of laboratory animals of the University of Groningen and Mexican governmental guideline NOM-033-ZOO-1995).

Financial support: obtained from the Graduate School of Medical Sciences (GSMS) of the University of Groningen, The Netherlands.

Acknowledgements: authors thank to Universidad Autónoma de Aguascalientes and University of Groningen for all the facilities and material provided to do this research study.

REFERENCES

1. Wang X., Wu Q., Liu A., *et al.* (2017). Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds *in vivo and in vitro*. *Drug Metab. Rev.*, 49(4): 395-437. doi:10.1080/03602532.2017.1354014
2. Kim Y.H., Hwang J.H., Kim K.S., *et al.* (2015). Metformin ameliorates acetaminophen hepatotoxicity via Gadd45 β -dependent regulation of JNK signaling in mice. *J. Hepatol.*, 63(1): 75-82. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.008
3. McGill M.R., Jaeschke H. (2013). Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharm. Res.*, 30(9): 2174-2187. doi:10.1007/s11095-013-1007-6
4. Chin Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. (2016). Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8(2): E239-E253. doi:10.1007/BF02854894.
5. González-Ponce H., Rincón-Sánchez A., Jaramillo-Juárez F., Moshage H. (2018). Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Nutrients*, 10(2):117. doi:10.3390/nu10020117
6. Krajka-Kuzniak V., Paluszczak J., Szafer H., Baer-Dubowska W. (2013). Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *Br. J. Nutr.* 110(12): 2138-2149. doi:10.1017/S0007114513001645
6. Krajka-Kuzniak V., Paluszczak J., Szafer H., Baer-Dubowska W. (2013). Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *Br. J. Nutr.* 110(12): 2138-2149. doi:10.1017/S0007114513001645

7. Tian J., Huang H., Hoffman B., *et al.* (2011). Gadd45 β is an inducible coactivator of transcription that facilitates rapid liver growth in mice. *J. Clin. Invest.*, 121(11):4491-4502. doi:10.1172/JCI38760

Pharmacokinetic model of lamotrigine in Mexican children with epilepsy

José Eduardo Juárez Hernández¹, José Rodrigo González Ramírez¹, Mara Medeiros Domingo², Gilberto Castañeda Hernández¹.

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Departamento de Farmacología, Ciudad de México.

²Hospital Infantil de México "Dr. Federico Gómez", Laboratorio de Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo, Ciudad de México.

Epilepsy is a complex disease that requires a fast, precise and efficient treatment to avoid severe consequences in patients' life.^[1] Lamotrigine is one of the main drugs used in the pharmacologic management of the disease,^[2] unfortunately, great variability in the therapeutic outcomes has been demonstrated when Lamotrigine is prescribed.^[4] To explain the pharmacokinetics variability of Lamotrigine we decided to approach through a pharmacokinetic model. Children were invited to the study if they had epilepsy diagnosis and used lamotrigine (from any manufacturer). Blood samples were taken at 6 different times: 0 hours, before the drug was administered, and after that at 1, 2, 4, 6 and 12 hours. We recruited a total of 16 patients and obtained 89 observations.

Using Phoenix NLME 8.0 and the first-order conditional estimation extended least squares (FOCE ELS) algorithm we were able to test several structural pharmacokinetic models, and a one- compartment, first order absorption model was selected. In regard to the structural model we obtained the following parameters: Ka 5.30 ± 0.03 (h⁻¹), V 113.17 ± 2.12 (L) and Cl 0.94 ± 0.07 (L/h). After covariate assessment was performed we found that concomitance with Valproate impacts significantly over clearance, as well as UGT2B7 polymorphisms.^[6; 7]

The largest variability in the structural model was in CL which improved in the full model, Ka is now the one with the largest variability, this may be associated with pharmaceutical quality issues found by our group.

The values obtained are:

```
stparm(Ka = 5.60283 * exp(4.6132923))
stparm(V = 112.226 * exp(0.0028306517))
stparm(Cl = 0.94859 * exp(-0.800187*(Val==1)) * exp(-0.457226*(UGT2B7==1))) *
exp(0.10728873))
```

This model will be enriched with extra monitoring points over time, hence, the model is still subject to refinement. The second phase will be an external validation at hospital to improve drug clinical outcomes and reduce adverse effects frequency.

REFERENCES

1. Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A., *et al.* (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4): 475-482. doi:10.1111/epi.12550
2. Patsalos P.N., Berry D.J., Bourgeois B.F., *et al.* (2008). Antiepileptic drugs best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 49(7): 1239-1276. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01561.x
3. Vaithianathan S., Raman S., Jiang W., *et al.* (2015). Biopharmaceutic Risk Assessment of Brand and Generic Lamotrigine Tablets. *Mol. Pharm.*, 12(7): 2436-2443. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00154
4. LeLorier J., Duh M.S., Paradis P.E., *et al.* (2008). Economic impact of generic substitution of lamotrigine: projected costs in the US using findings in a Canadian setting. *Curr. Med. Res. Opin.*, 24(4): 1069-1081. doi:10.1185/030079908X280572
5. Marcelin-Jimenez G., *et al.* (2009). Development of an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry micromethod for quantification of lamotrigine in human plasma and its use in a bioequivalence trial. *Bioanalysis*, 1(1): 47-55. doi:10.4155/bio.09.8
6. Xu S., Liu L., Chen Y., *et al.* (2018). Population pharmacokinetics of lamotrigine co-administered with valproic acid in Chinese epileptic children using nonlinear mixed effects modeling. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 74(5): 583-591. doi:10.1007/s00228-018-2414-8
7. Zhang Z.B., Ji S.M., Han Y., *et al.* (2017). Population pharmacokinetic models of lamotrigine in different age groups of Chinese children with epilepsy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 73(4): 445-453. doi:10.1007/s00228-016-2190-2

Effect of olanzapine on indicators of oxidative stress of people with schizophrenia

Claudia Verónica Palacios Magaña¹, Elba Margarita Romero Tejeda¹, Itzel de Jesús Álvarez Díaz²,
María Verónica Mireles García³, Carolina González González⁴, Fermín Paul Pacheco Moisés¹

¹Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara.

²Laboratorios Maver.

³Iberoil, De la R Asesoría en Servicios & Laboratorios, S.A. de C.V.

⁴Grupo Biotech S.A. de C.V.

Oxidative stress plays a fundamental role in the pathophysiology of schizophrenia [1-2]. The main objective of this work is to investigate the association of oxidative stress markers with plasma levels of olanzapine in Mexican patients diagnosed with schizophrenia. For this purpose, an analytical method using ultra-high pressure liquid chromatography with diode array detector (UHPLC-DAD) was developed in order to quantify plasma olanzapine. The plasma levels of oxidative stress markers (nitric oxide catabolites, protein carbonyls and catalase activity) were quantified using standard spectrophotometric methods. Blood samples were obtained from patients diagnosed with schizophrenia and healthy control subjects non-treated with olanzapine. The study was approved by the Jalisco's Institute of Mental Health. The sensitivity of the developed system is 1.2 ng/mL of olanzapine in plasma. The precision (%CV) of the chromatographic system was $\leq 2.0\%$. The clinical characteristics of healthy controls and patients with schizophrenia were similar ($P=0.6203$). In patients with treatment, no correlation was found between plasma levels of olanzapine and pharmacological dose ($R^2=1.32\%$). Compared to non-medicated controls, an increase in nitrite-nitrate levels was found in patients after one month of olanzapine treatment and with a decrease in psychotic symptoms ($P=0.0037$). Basal levels of protein carbonyls were significantly higher and they tend to decrease after a month of treatment with olanzapine ($P=0.0016$). Catalase activity increased after one month of treatment with olanzapine ($P=0.0005$). In patients there is a direct relationship between the plasma concentration of olanzapine and the plasma levels of nitrites-nitrates. No associations were detected between catalase activity and protein carbonyls levels with plasma levels of olanzapine.

REFERENCES

1. Soto-Bernardini, *et al.* (2008). Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. *Acta Médica Costarricense* 50: 197-202.
2. Tsai M.C., *et al.* (2013). Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: the effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry Research* 209: 284-290.

Pharmacokinetic evaluation of lyophilized kit formulations for the radiolabeling of monoclonal antibodies as theranostic tools in nuclear medicine applications

Alejandro Perera Pintado¹, Ignacio Hernández González², Mariela León Pérez², Nubia Martín Columbié², René Leyva Montaña³, Barbara García Moreno⁴, Naila Gómez González⁵, Yusniel Castro Alfonso², Miguel Infante Guerra⁴, Madian Pino⁴, Anaïs Prats Capote¹, Darién Toledo Santamaría⁶, Ángel Casacó Parada⁶, Yaiko Sadam Husein⁶, Yoiz Fano Machín⁵

¹Clinical Research Direction.

²Development Department.

³General Director.

⁴Department of Radiopharmacy.

⁵Assay and Inspection Department, Isotopes Centre.

⁶Research Division, Centre of Molecular Immunology.

Antibodies directed to tumor-associated antigens allow us the development of therapies against specific molecular targets improving treatment efficacy, while systemic toxicity is reduced. N-glycosylated gangliosides are not common in human normal tissues, they are just expressed in some tumor cells. On the other hand, EGF receptor is overexpressed in tumors of ectodermal origin, which constitutes almost 80% of all malignancies. Thus, both receptors are a very interesting targets for the immunotherapy. Monoclonal antibodies labeled with ^{99m}Tc, directed against EGF receptor and N-glycosylated gangliosides, can be used as theranostic tools, for the selection of patients with an overexpression of such molecular targets, the follow-up, and assessment of clinical efficacy of the immunotherapy with monoclonal antibodies. In the present work, we describe the radiolabeling procedure of monoclonal antibodies 14F7h (directed to N-glycosylated ganglioside) and nimotuzumab directed against EGF receptor as well as the development of a kit formulation. In order to compare *in vivo* behavior of Mabs in lyophilized formulation in comparison with traditional dissolution technique a pharmacokinetic study in tumor murine models were performed following a sparse data experimental design solved by means of non-linear mixed effect model approach using Monolix. In vivo images were also obtained using a planar gamma camera. Lyophilized formulation allowed the preparation of radiolabeled Mabs with a high radiochemical purity and with no modification of pharmacokinetic behavior and target tissue uptake.

Pharmacokinetics and pharmacogenetics of metformine in patients with type 2 diabetes mellitus

Miriam Nayeli Morales Barragán¹, Jaime Guillermo Rodríguez Rivera², María Angélica Aguilar Torres², Susanna Edith Medellín Garibay¹, Rosa del Carmen Milán Segovia¹, Silvia Romano Moreno¹

¹Laboratorio de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

²Servicio de Endocrinología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” San Luis Potosí, México.

Metformin is the first line pharmacological treatment for glycemic control in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) ^[1]. However, it is estimated that about 30% of patients do not respond adequately to the treatment that may be related to the high inter-individual variability in the kinetic behavior of this drug ^[2,3]. The aim of this study was to develop a population-based mixed effects pharmacokinetic model to evaluate the influence of genetic, anthropometric, pathophysiological, clinical and comedic factors on the kinetics of metformin in DM2 patients.

The study was approved by Research Ethics Committee and the Research Committee of the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (registration number 40-15) and under the knowledge of the Committee on Ethics in Research and Teaching of the Faculty of Chemical Sciences (code of registration: CEID2015055-S). A total of 70 adult patients with DM2 from the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” under chronic treatment with metformin were included.

The influence of anthropometric, clinical and comedication characteristics of the patients, as well as the presence of genetic polymorphisms OCT2-808 G>T(rs316019), OCT1 1260GAT>(rs72552763) and PMAT883-522 A>G(rs2685753) on the pharmacokinetic behavior of metformin was evaluated through NONMEM software (v7.3) using one- compartment open model with first-order absorption and elimination.

Plasmatic metformin concentrations at the steady state were determined by HPLC. The final population pharmacokinetic model obtained, was: Clearance (CL) = $15.9 + 0.308 \cdot \text{CLcr}$ for patients with creatinine clearance (CLcr) less than 120 mL/min and $\text{CL} = 49.3 \text{ L/h}$ in patients with CLcr equal to or greater than 120 mL/min. Metformin CL increases 22% in patients with the OCT1-1260 allele, while concomitant administration of clopidogrel decreases metformin CL by 43%. Volume of distribution is described by the following expression: $V = 4.37 \cdot \text{Total body weight}$. Internal validation was performed by bootstrapping, showing the accuracy and the stability of the final model developed.

Financial support

Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
No. Convenio C16-FAI-09-24.24

REFERENCES

1. Gil Velázquez L., Sil Acosta M., Domínguez Sánchez E., Torres Arreola L., & Medina Chávez J. (2013). Guía de práctica clínica Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 51(1): 104-19.
2. Semiz S., Dujic T., & Causevic A. (2013). Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes. *Biochemia Medica*, 154-171.
3. Dujic T., Zhou K., Donnelly L.A., Tavendale R., Palmer C.N., Pearson E.R. (2015). Association of organic cation transporter 1 with intolerance to metformin in type 2 diabetes: a GoDARTS study. *Diabetes* 64: 1786-1793

Understanding the impact of enteric reabsorption on drug pharmacokinetics T2

Manuel Ibarra, Pietro Fagiolino

Department of Pharmaceutical Sciences, School of Chemistry. Universidad de la República, Center of Bioavailability and Bioequivalence for Medicine Evaluation (CEBIOBE)

Enteric reabsorption occurs when a fraction of drug transferred from the arterial blood-stream to the gastrointestinal tract is subsequently reabsorbed back into the systemic circulation. When present as a discontinuous process, it can cause secondary or multiple peaks in the plasma-concentration-time profile. The most studied process of this kind is referred to as enterohepatic cycling (EHC), i.e. through hepatobiliary secretion. Many drugs and endogenous compounds are known to undergo EHC [1]. However, this is not an exclusive pathway: multiple-peak phenomena have been observed after intravenous administration of drugs of negligible bile secretion. Gastric secretion and enteral reabsorption has been observed for several basic drugs [2]. Drug reabsorption has always been a pharmacokinetic challenge, both in modeling as in the interpretation of its impact on drug bioavailability and disposition, which currently remains unclear. In this work, by using a semi-mechanistic pharmacokinetic model, we evaluate the impact of enteric reabsorption and assess different models through simulation and sensitivity analysis using the package mlxR (Lixoft®, France) at the R environment for statistical computing (R-project.org). Importantly, in order to fully represent the competition between hepatobiliary secretions and hepatic metabolism, the liver was represented as a peripheral compartment. Under the model established, equations were

deducted for systemic clearance and oral bioavailability. As expected, results showed that the reabsorbed fraction is positively correlated with the volume of distribution and drug half-life. Moreover, for EHC, we found that given the interplay between hepatobiliary secretion and hepatic drug metabolism: (i) a negative correlation is foreseen between the reabsorbed fraction and hepatic clearance, and (ii) oral bioavailability of drugs with high hepatic extraction and low gut-wall metabolism can result increased by a higher EHC magnitude. Simulations agreed with developed equations. In conclusion, drug reabsorption can have a significant impact on systemic exposition.

REFERENCES

1. Gao Y., Shao J., Jiang Z., Chen J., Gu S., Yu S., Zheng K., Jia L. (2014). Drug enterohepatic circulation and disposition: constituents of systems pharmacokinetics. *Drug Discovery Today* 19: 326-340
2. Davies N.M., Takemoto J.K., Brocks D.R., Yáñez J. (2010). Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition. *Clin. Pharmacokinet.*, 49: 351-377.

Development and characterization of metformin-loaded plga nanoparticles

D. Lopera, M Pecchio

Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología AIP (INDICASAT AIP).

Metformin is the drug of first choice in the treatment of type II diabetes. However, in order to maintain effective concentrations of metformin in plasma, the administration of repeated doses is necessary, thus increasing the incidence of its adverse effects, mainly gastrointestinal. The new drug delivery systems in nanoparticles have been shown to be able to increase the biological activity of different drugs, modulate their release and reduce their adverse effects. Therefore, applying this new technology in the administration of drugs such as metformin improve therapeutic profile. The objective of this work was the development of metformin-loaded PLGA nanoparticles loaded in order to obtain a formulation with a particle size smaller than 300 nm, in a homogeneous system for oral administration and controlled release profile.

In the present work, three metformin formulations were prepared following the desolvation method. To characterize the formulations, the following parameters were determined: size, polydispersity index, surface charge and encapsulation efficiency. Also in vitro release profile of the drug from the nanoparticles was determined.

We obtained nanoparticles sizes between 211 to 226 nm. The polydispersity index was lower than 0.3 in all prepared formulations, which indicates that there is a homogeneous

population of nanoparticles. On the other hand, the surface charge of the formulations is similar in all of them and they do not change when the drug is incorporated into the nanoparticles, preserving the stability of the system. Metformin showed a controlled release from the PLGA nanoparticles. Our results suggest that PLGA nanoparticle could be promising for the oral administration of metformin. In addition, the PLGA nanoparticles prepared by the desolvation method can be used as vehicles for other drugs with short elimination half-lives.

Key words: Metformin, PLGA nanoparticles, drug delivery systems, desolvation.

Covariates affecting phenobarbital pharmacokinetic parameters in dogs

Silvana Alvariza¹, Gimena Feijoo¹, Cecilia Maldonado², Natalia Guevara², Gonzalo Suarez¹, Marta Vázquez²

¹Pharmacology Department, Faculty of Veterinary, Universidad de la República.

²Therapeutic Drug Monitoring Service. Pharmaceutical Sciences Department.

Faculty of Chemistry. University Hospital. Montevideo, Uruguay

silvana.alvariza@gmail.com

Phenobarbital is an effective antiepileptic drug, both for human and canine epilepsy. Due to its narrow therapeutic index, its plasma concentrations must be monitored to improve the anticonvulsant therapy with this drug. In this work we investigate the covariates that affect its pharmacokinetic parameters in dogs. Sixty-six predose plasma samples of dogs under treatment with phenobarbital were analyzed at steady state. The impact of age, sex, body weight (WT) and total daily dose (TDD) on the apparent clearance (CL/F) and apparent volume of distribution (Vd/F) were analyzed using Monolix[®] software (Suite 2018R1, Lixoft S.A.S). A monocompartmental model was chosen, the absorption constant and the volume of distribution were fixed at 1.3 h⁻¹ and 20 L respectively based on bibliographic information. Age, WT and TDD were found to significantly affect CL/F of phenobarbital, $p < 0.01$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$ respectively.

Equations that best describes clearance was:

$$CL = CL_{pop}(WT/21)^{(\beta_{WT,CL})} \cdot (TDD/140)^{(\beta_{TDD})} \cdot (AGE/5)^{(\beta_{AGE})}.$$

Vd was added with the effect of WT as $V = V_{pop}(WT/21)$.

Being 21 the average WT in kg, 140 the TDD administered expressed in mg, and 5 the average age in years of the studied population. Typical parameters estimates were: $CL_{pop} = 0.218$ L/h, $\beta = 0.430$, $\beta_{TDD} = 0.490$, $\beta_{AGE} = -0.169$, and $\beta_{WT,V} = 0.542$.

Results showed an increase of clearance with body weight and the total dose administered, confirming the autoinductive capacity of phenobarbital on its elimination rate. On the other hand, there was a decrease of clearance with age, probably due to the decrease in renal function observed in this species in the elderly, since renal excretion represents about 30% of the total clearance of phenobarbital in dogs.

REFERENCES

1. Al-Tahan F. & Frey H.H. (1985). Absorption kinetics phenobarbital after and bioavailability of oral administration to dog. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 8: 205-207.
2. Hojo T., Ohno R., Shimoda M. & Kokue E. (2002). Enzyme and plasma protein induction by multiple oral administrations of phenobarbital at a therapeutic dosage regimen in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 25: 121-127.

Bioequivalence of ivermectin in combined formulations of Ivermectin / Fluzuron

Silvana Alvariza, Diego Robaina; Gonzalo Suárez

Laboratory of Pharmacology, Faculty of Veterinary. Universidad de la República, Uruguay silvana.alvariza@gmail.com

Ivermectin is widely used drug in the treatment of parasitic disease caused by ticks *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. However, there are numerous reports of resistant populations, so its association with Fluzuron (an acarine growth inhibitor) is a possible strategy, to increase the efficacy of treatments, and to avoid the appearance of resistance to fluzuron, the only drug that in Uruguay does not has reported cases of resistance.

A bioequivalence study was conducted to evaluate the product in pre-formulation phase containing the combination ivermectin/fluzuron, by subcutaneous route, by comparison with a reference product.

Twenty-four male calves weighting between 209 and 234 kg were selected and randomly assigned to Test or Reference group. Each group received 0.2 µg/kg of Ivermectin and 2.5 mg/kg of Fluzuron. Blood samples (10 mL) were collected from the jugular vein in heparinized tubes prior to dose and at 6, 24, 72, 96, 216, 312, 648 and 816 hours post-dose. Pharmacokinetic analysis was performed for Ivermectin using Monolix® software (Suite 2018R1, Lixoft S.A.S). Structural and statistical models were evaluated with basic goodness of fit plots and metrics and visual predictive checks

The final model included two compartments with a transit compartment absorption model and first linear elimination. Typical parameter estimates were: ktr: 0.0415

h-1, Mtt: 19.1h for reference product and 30.1h for Test product, CL/F= 6.5 L/h, V1=1130L, V2= 566 L and Q=2.22 L/h

Mean transit time product was significantly higher for Test product ($p < 0.001$). This model is expected to be useful for PKPD analysis on cattle populations infected with ticks

Therapeutic drug monitoring of vancomycin in patients of intensive care unit of the instituto nacional de neurología y neurocirugía

Francisca Palomares-Alonso¹, José Luis Soto Hernández¹, Nelly Castro^{1,2}, Dinora F. González Esquivel^{1,2}, Helgi Jung^{1,2}

¹Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Cd. de México. 14269, México.

²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, Cd. de México, 04510, México.

The consensus guidelines on TDM of vancomycin suggest the use of trough concentrations to dose patients, considering that AUC/MIC ratio (area under the concentration–time curve to minimum inhibitory concentration) is related with efficacy. Specifically, AUC/MIC ratio ≥ 400 is the suggested target. In order to examine the variability and utility of serum trough concentrations of vancomycin in patients with brain injury, we collected a data set to determine the AUC/MIC ratio and to identify the influencing factors on trough vancomycin concentrations.

Data were collected retrospectively over a three years period from ICU patients of Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, receiving vancomycin in a dose range from 1.5 to 3.0 g/day. Data from 23 patients with a median age of 42.75 years (range 14 to 76), a median body mass index of 25 kg/m² (18 to 34 kg/m²). All studies were approved by the institutional review Board (56/09). Predictive performance using a Bayesian PK method to estimate the 24-h vancomycin AUC was applied.

The vancomycin trough concentration variability was significant among patient samples. Only 17.49% of ICU patients met the concentration target of 15–20 mg/l while 65.21% showed subtherapeutic concentrations and 13.0% of them showed supratherapeutic concentrations (> 20 mg/l). Only 40 % of patients showed an AUC/MIC ratio above 400. In 90 % of patients with MIC of 2 mg/L or greater was observed an AUC/MIC ratio < 400 .

Further prospective studies are needed to evaluate the AUC monitoring in clinical practice in patients with brain injury. The concentrations and patients data, analyzed with software programs could increase the accuracy in vancomycin dosing.

Influence of experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in the benznidazole pharmacokinetics in mice

Leonardo Pinto¹, Suzana Marques de Jesus¹, Luisa Perin¹, Glauco Henrique Balthazar Nardotto²,
Claudia Martins Carneiro³

¹Immunopathology Laboratory, NUPEB, Federal University of Ouro Preto, Brazil.

²School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

³School of Pharmacy, Federal University of Ouro Preto, Brazil.

Trypanosoma cruzi infection leads to increased circulating levels of inflammatory cytokines network (1). Expression and/or activity of drug transporters are regulated by cytokines (2). Benznidazole (BNZ), the most commonly drug for treating Chagas disease, exhibits high variability in its efficacy and toxicity, especially in the chronic phase of disease. BNZ is considered a substrate and inducer of P-glycoprotein efflux transporter (3). To date, scarce information about the mechanisms of variability in the BNZ pharmacokinetics are available (4). This study aimed to evaluate the influence of experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in the BNZ pharmacokinetics in mice. Eighty female *Swiss* mice (n= 40 animals chronically infected with *Berenice-78* strain of *Trypanosoma cruzi* and 40 healthy animals) received a single oral dose of BNZ

100 mg/Kg. Serial blood samples were collected for 6h after BNZ administration (CEUA/UFOP n° 2016/58). BNZ serum concentrations were measured using HPLC- DAD. The software Phoenix[®] version 7.0 was used to perform pharmacokinetics analysis and software R version 3.1.2 was used for statistics. A one-compartment model with first-order absorption and linear elimination best described the BNZ pharmacokinetics in both infected and healthy mice. The chronic *Trypanosoma cruzi* infection increased the K_a (3.92 *vs* 1.82 h⁻¹), V_d/F (0.089 *vs* 0.036 L) and CL/F (0.030 *vs* 0.011 L/h), and decreased both T_{max} (0.67 *vs* 1.17 h) and $t_{1/2\alpha}$ (0.18 *vs* 0.38 h) as compared to healthy mice ($p \leq 0.05$). This is the first scientific evidence of the murine experimental Chagas disease influence the BNZ pharmacokinetics, probably by P- glycoprotein inhibition.

Supported by CNPq, Capes, FAPEMIG, PROPP/UFOP.

REFERENCES

1. Dutra W.O., *et al.* (2005). *Trends Parasitol.* doi: 10.1016/j.pt.2005.09.007
2. Liptrott N.J., *et al.* (2009). *Br. J. Pharmacol.* doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00050.x
3. Kratz J.M., *et al.* (2018). *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* doi: 10.1080/17512433.2018.1509704

3. Molina, I., *et al.* (2017). *Antimicrob. Agents Chemother.* doi: 10.1128/AAC.01912-16.

Dog model predict the benznidazole pharmacokinetics in clinical trials

Leonardo Pinto¹, Israel Molina², Glauco Henrique Balthazar Nardotto³, Claudia Martins Carneiro⁴

¹Immunopathology Laboratory, NUPEB, Federal University of Ouro Preto, Brazil. ²Tropical Medicine and International Health Unit, Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

³School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

⁴School of Pharmacy, Federal University of Ouro Preto, Brazil.

There is a translational challenge and a need for standardization of animal models in Chagas disease (CD) drug discovery. The dog has been considered a suitable model to study both CD immunopathology and treatment efficacy (1). Benznidazole (BNZ) is the model drug that the new drugs candidates should be compared in CD drug screening (2). This study aimed to compare the BNZ pharmacokinetic profile in eight healthy undefined breed dogs (CEUA/UFOP: 2016/37) with our previously published study in eight healthy adult volunteers (EudraCT 2013-003381-14) (3). After single oral dose of BNZ 100 mg administration, blood collection was performed at intervals up to 48h for dogs and 72h for humans. The dog samples were analyzed by HPLC-DAD and human samples by UPLC-MS/MS. The pharmacokinetic analysis was performed using software Phoenix[®] version 7.0. In both dogs and humans, the one-compartment model with first-order absorption and linear elimination best described the BNZ pharmacokinetics. Similar K_a (0.90 *vs* 1.16 h⁻¹), T_{max} (3.77 *vs* 3.50 h), V_d/F (0.50 *vs* 0.49 L/Kg), CL/F (0.04 *vs* 0.03 L/h/Kg), $t_{1/2el}$ (9.10 *vs* 12.1 h) and K_{el} (0.08 *vs* 0.06 h⁻¹) were observed in dogs and humans, respectively. Our results showed remarkable consistency in the pharmacokinetics profiles with good absorption, high distribution and moderately slow elimination between dogs and humans. Therefore, it's possible BNZ pharmacokinetic translation from dog model to clinical trials.

Supported by CNPq, Capes, FAPEMIG, PROPP/UFOP.

REFERENCES

1. Chatelain E. (2015). *J. Biomol. Screen.* doi: 10.1177/1087057114550585
2. Chatelain E. and Konar N. (2015). *Drug Des. Devel. Ther.* doi: 10.2147/DDDT.S90208
3. Molina I., *et al.* (2017). *Antimicrob Agents Chemother.* doi: 10.1128/AAC.01912-16

Predictive performance of a vancomycin population pharmacokinetic model in Mexican patients

Martínez-Medina Rosa María¹, Colom-Codina H², Sánchez-Palacio JL³, Magaña-Aquino Martín⁴,
Pérez-Urizar José¹

¹Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

²Universidad de Barcelona.

³Universidad Autónoma de Baja California.

⁴Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

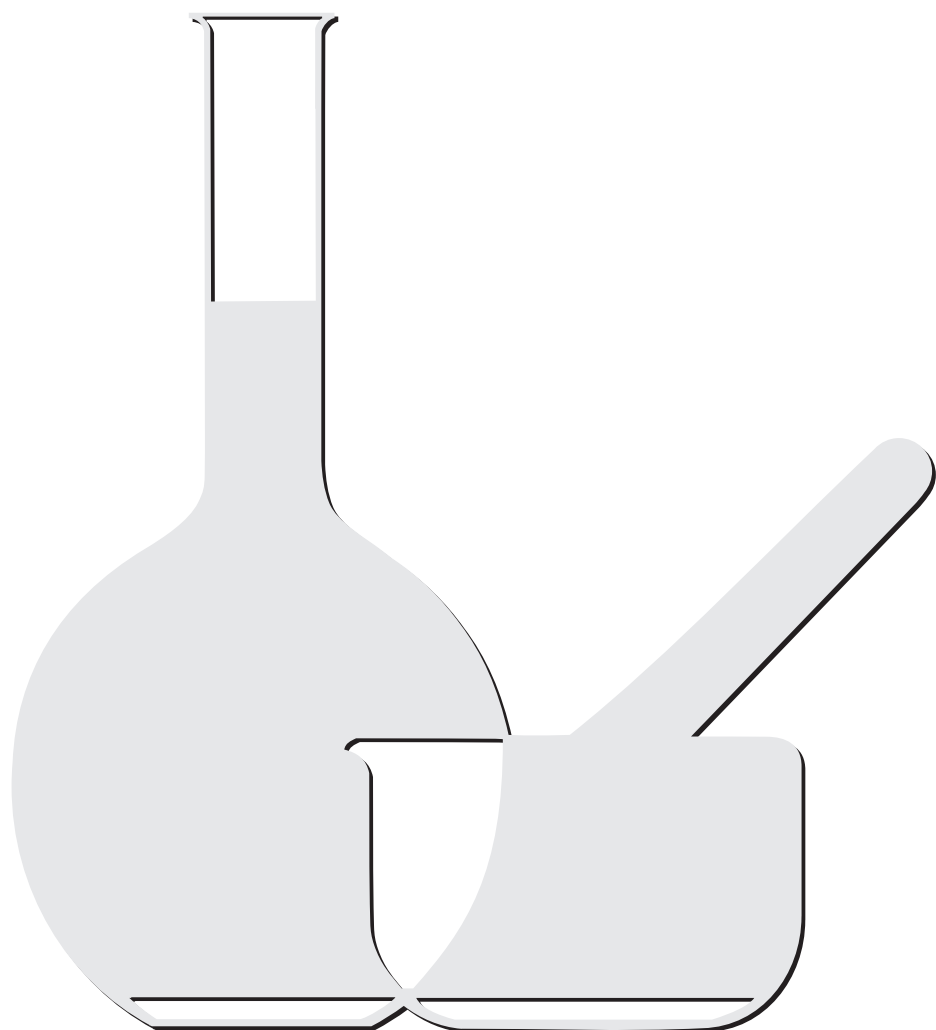
Population pharmacokinetics is a useful approach that takes into account inter- and intra- individual variability to individualize the drug therapy, however in view of the complex statistical methodology involved in the use of such models, model evaluation is an important issue. The aim was to externally evaluate the predictive performance and generalizability of a previously published population model of vancomycin. Indeed, a published vancomycin population pharmacokinetic model [1] was implemented in NONMEM 7.4. The external validation cohort consisted of adult patients receiving vancomycin from a clinical, prospective, descriptive and observational study carried out during 6 months. The model was used to predict peak and trough concentration for each patient. To explain the variability of the prediction, population was divided into groups, of each one, mean prediction error (*me*), the root mean squared prediction error (*rmse*) and the standardized mean prediction error (SMPEj) were calculated. Also, a VPC analysis was performed and pharmacokinetic parameters were compared. As results the *me* method show a small value with a width range of variability, but SMPEj method that takes in count the data type, showed a better predictability of the model, supported by de VPC analysis. Finally, this model could make accurately prediction of vancomycin trough concentrations of patients with non-severe infections and provides evidence to demonstrate predictive performance and generalizability of the model to be used in therapeutic monitoring of vancomycin patients.

Ethical approve: ethics and research committee of the “Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto” Register: 53-12

Financial Support: this work was supported by the Fondo Mixto (FOMIX) of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), under project number FMSLP- 2014-02-250277. Rosa M. Martínez-Medina received a CONACyT fellowship with number 389437.

REFERENCES

1. Sánchez J.L., Domínguez A.R., Lane J.R., *et al.* (2010). Population pharmacokinetics of vancomycin in adult and geriatric patients: comparison of eleven approaches. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 48(8): 525-533.



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 Palavras 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, 48(1)
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.



