

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

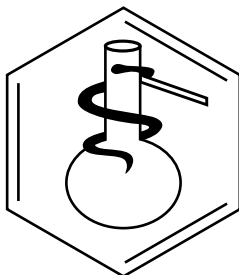


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



**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. Irujo, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

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

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

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

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

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

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

Comité Editorial:

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

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

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

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

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

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

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

Evaluadores:

Constain H. Salamanca, Ph. D., Maestría en Formulación de Productos Químicos y Derivados, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Icesi, Santiago de Cali, Colombia.

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

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

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

Diego I. Caviedes, Ph. D. (C), Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, 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.

Viviana Mourinho, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, 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.com

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

- Complejidad de la transición de los esquemas antirretrovirales en un programa de atención de VIH en Bogotá durante el periodo de 2015-2017
Leonardo Arévalo-Mora, Sonia Moscoso, Alcides Acosta, Mónica Mantilla 505
- Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela
Franklin Pacheco-Coello, Doralys Ramírez-Azuaje, Ibis Pinto-Catari, María Peraza-Marrero, Corymar Orosco-Vargas 521
- Thermodynamic analysis of celecoxib in amphiprotic and amphiprotic-aprotic solvent mixtures at several temperatures
M. Ángeles Peña, Begoña Escalera, Norma Torres 528
- Descripción teórica de la posibilidad de la detección electroquímica de la gabapentina, asistida por CoO(OH)
Volodymyr Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Olga Luganska, Hélder Briosa e Gala, Karina V. Palamarek, Inna P. Danyliuk, Petro I. Yagodynets ' 547
- Síntesis, caracterización y evaluación farmacológica de nuevos complejos metálicos derivados de híbridos heteroaromáticos (benzimidazol/oxadiazol)
Ingri Y. Váquiro-Reyes, Alberto Aragón-Muriel, Dorian Polo-Cerón 557
- Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos)
Anthony López, Katerine Herazo, Reinaldo G. Sotomayor 589
- A prototype of a low-cost eyelid cleaning foaming solution for symptom management in patients with chronic blepharitis: An I-optimal mixture experimental design
Francisco Javier Burgos-Flórez, Roxana de las Salas 615

- Aplicación de un diseño factorial 2^3 en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*
Wilson Ávila Ávila, Oscar J. Medina Vargas, Lucía M. Moreno Bastidas 643
- A descrição teórica da detecção eletroanalítica do letrozol, assistida pelo compósito VO(OH)-polipirrol, obtido catodicamente
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Nataliia M. Storoshchuk,
Sílvio C. de Oliveira, Olga V. Luganska, Vira V. Kopiika,
Hélder Briosa e Gala, Ali Baddouh, Petro I. Yagodynets' 662
- Development of a new Colombian product, effective for the treatment of carious lesions: a case study
Milton Enrique Londoño-Lemos, Ocar Bustamante 677
- Análisis por FTIR y DSC de complejos polielectrolito entre Eudragit® E100 y ácido benzoico como evidencia de hidrólisis de los grupos éster del polímero
Leidy J. Dallos, Rubén H. Manzo, Yolima Baena 700
- Volumetric behaviour of tetra-*n*-butyl ammonium bromide in various solvents at different temperatures
Shipra Baluja, Elham Abdullah Mo Alnayab 722
- Potentialities of the Colombian propolis in pharmaceuticals and cosmetics: A standpoint from the quality control
Yuly Ximena Correa-González, Maritza Adelina Rojas-Cardozo,
Claudia Elizabeth Mora-Huertas 762
- Determinación y comparación cualitativa de cannabinoides presentes en productos naturales comerciales del departamento del Cauca, Colombia
Johnnatan Mauricio Giraldo, Ricardo Benítez Benítez,
Rodrigo Andrés Sarria-Villa, Paola Andrea Arango, Jaime Martin Franco 789

Complejidad de la transición de los esquemas antirretrovirales en un programa de atención de VIH en Bogotá durante el periodo de 2015-2017

Leonardo Arévalo-Mora*, Sonia Moscoso, Alcides Acosta, Mónica Mantilla

Grupo de Investigación del Centro de Expertos para Atención Integral. CEPAIN IPS. Bogotá, D.C., Colombia.

*Correo electrónico: larevalom79@hotmail.com

Recibido para evaluación: 27 de diciembre de 2018

Aceptado para publicación: 11 de julio de 2019

RESUMEN

Cuando se decide cambiar una terapia antirretroviral se puede llegar a limitar futuras opciones, y es allí donde las conductas del personal tratante deben ser las más acertadas. Se realizó un estudio transversal-descriptivo, revisando las principales causas de cambios de esquema en los pacientes VIH de la IPS CEPAIN de Bogotá (Colombia) durante el periodo 2015-2017. Los cambios de tratamiento se estimaron en 8,1%; 8,8% y 5,8% durante los 3 años, el principal motivo de cambio fueron las reacciones adversas con 53,1%; 46%, y 49,6% respectivamente, seguidos de simplificación con 17,5; 25,1 y 26,5% y fracaso terapéutico en 19,8; 20,9 y 14,8% para cada año. Durante el primer año de tratamiento existió la necesidad de cambiar los esquemas en 12,9; 18,5, y 7,6% de los pacientes que iniciaron tratamiento en esos respectivos años. Las decisiones en los cambios de tratamiento antirretroviral involucran la introducción de nuevos antirretrovirales, la necesidad de reducir el número de tabletas o medicamentos, distintos perfiles de eficacia, tolerancia, efectos secundarios, toxicidad, barrera genética e interacciones. Otros factores a tener en cuenta son: el costo creciente de los medicamentos antirretrovirales, la dinámica en la transición y aplicación de los nuevos esquemas para garantizar un enfoque clínico, y económico sustentable.

Palabras clave: VIH, terapia antirretroviral altamente activa, efecto de los fármacos, negativa del paciente al tratamiento.

SUMMARY

Complexity of the transition of antiretroviral regimens in a HIV care program in Bogota during the period of 2015-2017

At the time of making changes in the antiretroviral therapy, future options may be limited, and this is the time when the behavior of the treatment staff should be the most appropriate. A transversal-descriptive study was conducted, studying the main causes of scheme changes in HIV patients of the IPS CEPAIN in Bogotá (Colombia) during the 2015-2017 period. Treatment changes were estimated at 8.1%, 8.8% and 5.8% during the 3 years, the main reason for change were adverse reactions with 53.1%, 46% and 49.6% respectively, followed by simplification with 17.5, 25.1 and 26.5% and therapeutic failure in 19.8, 20.9 and 14.8% for each year. During the first year of treatment, there was a need to change the regimens in 12.9, 18.5, and 7.6% of the patients who started treatment in those years. Decisions on antiretroviral treatment changes involve the introduction of new antiretrovirals, reduce the number of tablets or drugs, different profiles of efficacy, tolerance, side effects, toxicity, genetic barrier and interactions. Other factors to take into account are rising cost of antiretroviral drugs, the dynamics in the transition and the application of the new schemes to ensure a clinical and sustainable economic approach.

Key words: HIV, antiretroviral therapy highly active, drug effects, treatment refusal.

INTRODUCCIÓN

La implementación del tratamiento con medicamentos antirretrovirales cambió para siempre el comportamiento de la historia natural de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los desenlaces como la prevalencia de infecciones oportunistas y la mortalidad en los pacientes [1]. El objetivo del esquema farmacológico es inhibir la replicación viral, y como consecuencia se logra reconstituir el sistema inmunológico sin el daño a los linfocitos CD4+ por el virus, lo cual ha aumentado la expectativa de vida de las personas y ha tenido una mayor incidencia en enfermedades relacionadas con la edad, como las enfermedades metabólicas, cardiovasculares y renales [2]. Sin embargo, el tratamiento antirretroviral (TAR) puede fracasar por diversos factores como el nivel de toxicidad, los efectos adversos de los antirretrovirales, las alteraciones en la absorción, la resistencia viral primaria, o la resistencia adquirida por dificultades en adherencia [3, 4].

Por lo cual, se debe descartar causas no relacionadas con la resistencia antes de indicar un cambio en el esquema, ya que cuando se cambia una terapia antirretroviral se puede llegar a limitar futuras opciones, y es allí donde las conductas del personal tratante

deben ser las más acertadas. Un cambio inadecuado puede generar un fracaso terapéutico, resistencia viral, aumento innecesario de los efectos secundarios e incremento en los costos de atención [5]. Siempre hay riesgos en los cambios que se puedan dar en el manejo antirretroviral, como efectos a corto y a largo plazo, desde las reacciones adversas hasta los cambios de tipo sistémico y metabólico [6-10].

Se ha reportado que las causas de cambios en los esquemas y de su abandono suelen estar relacionadas con efectos secundarios, fatiga por parte del paciente hacia la ingesta del tratamiento, o factores relacionados al estilo de vida de los pacientes [11]; sin embargo, otro tipo de factores pueden también modificar las decisiones sobre cambios terapéuticos en diferentes áreas, como en África donde un cambio de política tuvo un impacto significativo que se asoció con el tipo de tratamiento, el año de tratamiento, el sexo y la etapa de la enfermedad [12].

Y esta tendencia es más evidente a lo largo del tiempo, en España hace más de un decenio el tiempo promedio de duración del primer esquema antirretroviral era de 427 días, y los principales motivos de cambio del primer TAR eran efectos secundarios (47%), fracaso terapéutico (9%), abandono voluntario (6%), simplificación TAR (7%); 15% eran pérdidas de seguimiento y tan solo el 9% continuaba con el primer tratamiento al final del periodo [13]; pero ahora el acceso a nuevos fármacos con combinaciones más cómodas y seguras ha permitido que los profesionales encargados cambien el enfoque del manejo del paciente hacia la simplificación de los esquemas con un 37% como causa de cambio en la misma región [14].

De otro lado, Brasil, que ha tenido una historia de acceso a medicamentos diferente al resto de Latinoamérica, reportó en el 2017 que el medicamento antirretroviral más cambiado fue el efavirenz, con un tiempo promedio de modificación del esquema antirretroviral de 120 días, y con las reacciones adversas como la causa más prevalente [15].

En este contexto, los continuos avances tecnológicos, así como las estrategias de comercialización y distribución han permitido introducir continuamente nuevos medicamentos; las alternativas para cambiar un tratamiento por causas diferentes al fracaso virológico son más accesibles. Tener al alcance más opciones que permitan cambios exige un mejor análisis, que permita conocer el entorno individual, e introspección científica de opciones futuras [5].

Con este estudio se busca conocer cuáles son las principales causas de cambios de esquema antirretroviral en un programa de atención a VIH de la ciudad de Bogotá.

METODOLOGÍA

La población objeto de este estudio estuvo conformada por pacientes atendidos en la Institución Prestadora de Servicios de Salud CEPAIN IPS de la ciudad de Bogotá,

D.C. (Colombia), el programa atiende a 4551 pacientes con infección por VIH, 77,5% hombres, y 22,5% mujeres. La información necesaria se obtuvo de una base de datos en la cual se registraron las variables clínicas requeridas por el protocolo de investigación, sin identificación personal de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, cumpliendo los estándares de anonimato y confidencialidad. Se excluyeron datos de personas menores de 18 años, y pacientes que estaban inactivos por inasistencia mayor a 12 meses. En la recolección de datos se revisaron las historias clínicas, los reportes de reacciones adversas (farmacovigilancia), los reportes de médicos de cambios de tratamiento, e información registrada en las discusiones de casos clínicos de la junta médica de la institución y, además, se desarrolló un estudio transversal descriptivo para registrar los cambios de tratamiento durante el periodo de 2015-2017.

RESULTADOS

Se incluyó el total de pacientes en seguimiento durante los 3 años de estudio 2015 al 2017; 4233, 4572 y 4551 pacientes, correspondientes a los años 2015, 2016 y 2017 respectivamente. Los cambios de tratamiento realizados corresponden a 343 (8,1%), 402 (8,8%) y 264 (5,8%), sus características se describen en la tabla 1. En los pacientes en que se registró cambios, los hombres tienen una mayor proporción con un 87%, comparado con las mujeres (13% restante, dada la relación hombre-mujer de pacientes atendidos); sin embargo comparado con el total de la población del programa, se encontró que en el 2015 no hubo diferencias significativas en la tasa de cambio entre hombres y mujeres, 8,20 % y 8,12 % respectivamente, 9,40 % y 5,64 % para el 2016, y para el 2017 se presentó un mayor cambio en las mujeres siendo de 6,8% comparado con los hombres de 5,68 %. Sin embargo, este cambio no es estadísticamente significativo ($p=0,186$). La mayoría de los casos de cambio de tratamiento antirretroviral se distribuyeron en la población de 30-39 años con un 36 %, y en 40-49 años con un 32 %.

En los 3 años del estudio en total se presentaron 1009 cambios de tratamiento; la mayor causa de estos fueron las reacciones adversas al medicamento 49 % (498 casos), seguido de simplificación de la medicación 23% (231 casos), el fallo terapéutico 19% (191 casos); las interacciones, medicamentosas, comorbilidades y otros ocuparon el 9% de las causas del cambio de TAR.

La distribución de las causas de cambio se presenta en la tabla 2. Se pudo constatar que en esta población las principales causas de cambio de los esquemas antirretrovirales fueron los eventos adversos asociados a intolerancia gástrica, así como los cambios metabólicos considerando que se trata de medicación de uso prolongado, otros eventos destacables son los asociados a alergias por la medicación.

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con cambios en esquema antirretroviral.

| | 2015 <i>n</i> (%) | 2016 <i>n</i> (%) | 2017 <i>n</i> (%) |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| Grupo de edad | | | |
| 15-19 | 1 (0,3) | 2 (0,5) | 0 (0) |
| 20-24 | 15 (4,4) | 33 (8,2) | 17 (6,4) |
| 25-29 | 45 (13,1) | 59 (14,7) | 34 (12,9) |
| 30-39 | 121 (35,3) | 142 (35,3) | 100 (37,9) |
| 40-49 | 94 (27,4) | 100 (24,9) | 61 (23,1) |
| 50-59 | 48 (14) | 52 (12,9) | 33 (12,5) |
| 60-69 | 16 (4,7) | 13 (3,2) | 15 (5,7) |
| >69 | 3 (0,9) | 1 (0,2) | 4 (1,5) |
| Género | | | |
| Masculino | 295 (86) | 366 (91) | 219 (83) |
| Femenino | 48 (14) | 36 (9) | 45 (17) |
| Proporción anual por cambios de tratamiento/pacientes | | | |
| Masculino | 295 (8,2) | 366 (9,4) | 219 (5,6) |
| Femenino | 48 (8,1) | 36 (5,6) | 45 (6,8) |
| Estadio CDC inicial | | | |
| 1 | 38 (11,1) | 104 (25,9) | 109 (41,3) |
| 2 | 150 (43,7) | 184 (45,8) | 115 (43,6) |
| 3 | 155 (45,2) | 114 (28,4) | 40 (15,2) |
| CD4 inicial | | | |
| <200 | 69 (20,1) | 69 (17,2) | 39 (14,8) |
| 200-500 | 168 (49) | 175 (43,5) | 113 (42,8) |
| >500 | 106 (30,9) | 158 (39,3) | 112 (42,4) |
| Carga viral inicial | | | |
| <100 000 | 315 (91,8) | 370 (92) | 251 (95,1) |
| >100 000 | 28 (8,2) | 32 (8) | 13 (4,9) |

(Continúa)

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con cambios en esquema antirretroviral.

| | 2015 <i>n</i> (%) | 2016 <i>n</i> (%) | 2017 <i>n</i> (%) |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Tratamiento inicial | | | |
| AZT+3TC+ INNTR | 124 (36,2) | 101 (25,1) | 72 (27,3) |
| AZT+3TC+ IP | 42 (12,2) | 19 (4,7) | 36 (13,6) |
| ABC+3TC+ INNTR | 42 (12,2) | 65 (16,2) | 48 (18,2) |
| ABC+3TC+ IP | 38 (11,1) | 60 (14,9) | 26 (9,8) |
| TDF+FTC+ INNTR | 28 (8,2) | 43 (10,7) | 28 (10,6) |
| TDF+FTC+ IP | 19 (5,5) | 34 (8,5) | 31 (11,7) |
| TDF+FTV+ II | 5 (1,5) | 14 (3,5) | 4 (1,5) |
| Otros | 45 (13,1) | 66 (16,4) | 19 (7,2) |
| Total | 343 | 402 | 264 |

Abreviaturas: CD4: recuento linfocitos CD4+; ABC: abacavir; AZT: zidovudina; 3TC: lamivudina; TDF: tenofovir; FTC: emtricitabina; INNTR: inhibidores no nucleósidos de transcriptasa reversa; IP: inhibidores de proteasa; II: inhibidores de integrasa.

Para el 2015, los mayores cambios por eventos adversos fueron causados por didanosina, situación que se modificó en el lapso de 2016-2017, en el que disminuyeron notablemente ya que esa molécula se encuentra en desuso por los efectos tóxicos reportados, además en las guías de atención del país no era recomendada [16-18].

Para el 2016, los medicamentos inhibidores de la proteasa causaron los porcentajes más altos de RAM, atazanavir, 12,41% seguido lopinavir/ritonavir, 10,24%; estos porcentajes se calcularon respecto al total de pacientes que consumieron el mismo medicamento en el periodo descrito. Así mismo, se observó un aumento progresivo de la simplificación de la medicación como causa de cambio, que inicio con un 17,5% para 2015 y pasó a 25,1 y 26,5% para los siguientes dos años, 231 casos en total. También se realizó el control respectivo posterior a 8 semanas de cambio en estos pacientes observándose que continuaban con éxito virológico para 2015 el 95%, en 2016 el 92%, y 2017 el 90%, hubo cargas virales detectables en 5% para 2015 y 2016, y no se logró practicar laboratorios de control debido a traslados de la población en 3% para 2016 y 5,8% en 2017, además 2,8% de los pacientes suspendieron los controles para el 2017.

La tercera causa de cambio de tratamiento encontrada en el estudio se asoció a fracaso terapéutico, afectando al 19% de la población, se registraron 68, 84 y 39 casos para 2015, 2016 y 2017 respectivamente, para un total de 191 casos.

Tabla 2. Causas de cambio en tratamiento antirretroviral.

| | 2015 N.º (%) | 2016 N.º (%) | 2017 N.º (%) |
|--|--------------|--------------|--------------|
| Causa de cambio | | | |
| Reacción adversa | 182 (53,1) | 185 (46,0) | 131 (49,6) |
| Fallo terapéutico | 68 (19,8) | 84 (20,9) | 39 (14,8) |
| Interacciones medicamentosas | 1 (0,3) | 15 (3,7) | 6 (2,3) |
| Comorbilidades | 15 (4,4) | 2 (0,5) | 4 (1,5) |
| Simplificación | 60 (17,5) | 101 (25,1) | 70 (26,5) |
| Otros | 17 (5,0) | 15 (3,7) | 14 (5,3) |
| Clasificación de RAM por órgano-sistema | | | |
| Metabólica | 60 (33) | 44 (23,8) | 30 (22,9) |
| Dermatológica | 43 (23,6) | 22 (11,9) | 15 (11,5) |
| Gastrointestinal | 30(16,5) | 49 (26,5) | 21 (16,0) |
| SNC | 26(14,3) | 42 (22,7) | 43 (32,8) |
| Hepatobiliar | 12 (6,6) | 23 (12,4) | 12 (9,2) |
| Hematológica | 9 (4,9) | 1 (0,5) | 0 (0,0) |
| Renal | 2 (1,1) | 4 (2,2) | 10 (7,6) |
| Descripción reacción adversa | | | |
| Intolerancia gástrica | 36 (19,8) | 50 (27,0) | 22 (16,8) |
| Lipodistrofia | 44 (24,2) | 28 (15,1) | 10 (7,6) |
| Brote/rash | 39 (21,4) | 21 (11,4) | 15 (11,5) |
| Alteraciones en estado anímico | 16 (8,8) | 24 (13,0) | 25 (19,1) |
| Ictericia | 8 (4,4) | 24 (13,0) | 12 (9,2) |
| Dislipidemia | 8 (4,4) | 7 (3,8) | 5 (3,8) |
| Aumento de transaminasas | 6 (3,3) | 2 (1,1) | 1 (0,8) |
| Anemia | 9 (4,9) | 1 (0,5) | 0 (0,0) |
| Alteraciones en el sueño | 1 (0,5) | 8 (4,3) | 17 (13,0) |
| Mareo | 1 (0,5) | 8 (4,3) | 0 (0,0) |
| Otros | 14 (7,7) | 12 (7,0) | 24 (18,0) |

(Continúa)

Tabla 2. Causas de cambio en tratamiento antirretroviral.

| | 2015 N.º (%) | 2016 N.º (%) | 2017 N.º (%) |
|-----------------------------|--|----------------|----------------|
| Medicamento asociado | N.º de tratamientos/ n.º de tratamientos totales (%) | | |
| AZT | 60/1314 (4,57) | 25/858 (2,91) | 12/1282 (0,94) |
| EFV | 33/1480 (2,23) | 53/1156 (4,58) | 47/2476 (1,9) |
| LOP/r | 28/626 (4,47) | 47/459 (10,24) | 31/979 (3,17) |
| ABC | 23/1308 (1,76) | 12/1112 (1,08) | 14/2453 (0,57) |
| NVP | 15/622 (2,41) | 6/494 (1,21) | 6/667 (0,15) |
| ATV | 13/348 (3,74) | 33/266 (12,41) | 15/987 (1,52) |
| DDI | 4/21 (19,05) | (0,0) | (0,0) |
| TDF | 2/625 (0,32) | 5/682 (0,73) | 9/1867 (0,48) |
| FPV | 2/35 (5,71) | (0,0) | (0,0) |
| 3TC | 1/2607 (0,04) | 2/1990 (0,10) | 2/3769 (0,05) |
| DRV | 1/136 (0,74) | (0,0) | (0,0) |
| RAL | (0,0) | 2/133 (1,5) | (0,0) |

Abreviaturas: RAM: reacción adversa al medicamento; SNC: sistema nervioso central; ABC: abacavir; AZT: zidovudina; 3TC: lamivudina; TDF: tenofovir; FTC: emtricitabina; EFV: efavirenz; NVP: nevirapina; LOP/r: lopinavir-ritonavir; ATV: tazanavir; DDI: didanosina; FPV: fosamprenavir; DRV: darunavir; RAL: raltegravir.

Para evaluar la efectividad del manejo antirretroviral se estratificó la población por el resultado de la carga viral antes del cambio de TAR en menores de 1000 copias/mL, y mayores de 1000 copias/mL, y en el seguimiento se tomó una carga viral a las 8 semanas de tratamiento para determinar si se presentaba una adecuada disminución del virus en por lo menos dos logaritmos.

Para el 2015, los 12 pacientes con carga viral menor a 1000 copias alcanzaron la indetectabilidad, mientras que, de los 56 pacientes con cargas virales mayor a 1000 copias, 37 registraron a las 8 semanas carga viral menor a 40 copias; 10 pacientes, menor a 1000 copias, y 9 pacientes descendieron los dos logaritmos esperados ya que tenían niveles muy altos de carga viral. En el 2016, los 16 pacientes con carga viral menor de 1000 copias presentaron resultados de indetectabilidad a las 8 semanas; de los

68 pacientes con carga viral mayor a 1000 copias, 40 alcanzaron carga viral menor a 40 copias y de 16 pacientes menor de 1000 copias, 12 obtuvieron rangos de carga viral mayor a 1000 copias, pero descendieron los dos logaritmos.

En el seguimiento para el 2017, los 7 pacientes que tenían carga viral menor de 1000 copias 5 alcanzaron la indetectabilidad, 1 paciente se mantuvo en el mismo rango sin disminución logarítmica, y el paciente restante abandono el programa; mientras que de los 32 pacientes con cargas virales mayores a 1000 copias, 23 registraron indetectabilidad en su carga viral y 8 pacientes menor de 1000 copias, 1 paciente permaneció en el rango de carga viral mayor a 1000 copias, pero descendió los dos logaritmos esperados.

Por otra parte, se realizó el análisis del cambio de tratamiento antes de cumplir el primer año de tratamiento (48 semanas), durante el primer año de tratamiento existió la necesidad de cambiar los esquemas de 62 pacientes en 2015, 74 pacientes en 2016 y 46 pacientes en 2017, de 478, 400 y 605 pacientes a quienes se inició tratamiento en esos respectivos años (12,9, 18,5, y 7,6%). Al realizar los controles respectivos en cargas virales se evidenció que 91, 94,1 y 94,9% habían alcanzado cifras de supresión viral. También se observó que las reacciones adversas a medicamentos continúan ocupando la primera causa de cambio de tratamiento (70%), seguido por simplificación (12%), y fallo terapéutico (10%), en menor nivel comorbilidades en 3%, e interacciones 2%. Los tipos de reacciones adversas presentados, y la relación con el medicamento especificado se encuentran en la tabla 3.

El porcentaje de casos de fracaso virológico durante las primeras 48 semanas para el 2015 era 0,8% de los pacientes iniciados, 3 por adherencia y 1 paciente por abandono; en 2016 se presentaron los 11 casos de fracaso, 2,8% de los pacientes que iniciaron TAR, las causas fueron establecidas como 4 casos por resistencia primaria y 7 por problemas en adherencia. Para 2017, 4 casos (0,6%) se trataron 2 casos de resistencia primaria y 2 por problemas en adherencia. Se procedió a revisar el reporte de la carga viral a las 8 semanas después del cambio para evaluar el descenso logarítmico de la misma y determinar efectividad del nuevo esquema y se encontró que de los 4 pacientes que se encontraban en el grupo con carga viral menor a 1000 copias todos registraron indetectabilidad en los 3 años. De los 13 pacientes que tenían reportes de carga viral mayor a 1000 copias, 10 lograron cargas virales indetectables, y solo 3 se mantuvieron mayor a las 1000 copias, 2 casos en el 2015 y uno en el 2016, sin embargo, analizando la carga viral inicial se observó que tenían niveles de viremias muy elevados y que descendieron los dos logaritmos esperados considerándose que habían logrado el objetivo terapéutico para las 8 semanas.

Tabla 3. Reporte de cambios de medicación antes de 48 semanas de iniciar el tratamiento antirretroviral.

| Causas asociadas al cambio de medicación antes de 48 semanas | | | | | | | | |
|--|-----|----------------|-------------------|----|-----|---------------------|-----|------|
| Año | RAM | Simplificación | Fallo terapéutico | TB | VHC | Otras interacciones | IRC | Otro |
| 2015 | 44 | 8 | 4 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 2016 | 47 | 10 | 11 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2017 | 37 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Medicamento asociado al tipo de cambio a las 48 semanas de iniciar de tratamiento | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-----|
| Causa de cambio | AZT | ABC | TDF+FTC | 3TC | EFV | NVP | LOP/r | ATV/r | DRV/r | RAL |
| RAM gastrointestinal | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 4 | 0 | 0 |
| RAM metabólica | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| RAM hematológica | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RAM hepatobiliar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 16 | 0 | 0 |
| RAM renal | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RAM SNC | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RAM dermatológica | 1 | 27 | 1 | 1 | 17 | 7 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| Fallo terapéutico | 0 | 0 | 3 | 0 | 6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TB | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Tto coinfección hepatitis C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Simplificación | 11 | 1 | 5 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| Interacciones | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Otro | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Total | 22 | 28 | 21 | 1 | 48 | 19 | 12 | 30 | 0 | 2 |

Abreviaturas: RAM: reacción adversa al medicamento; SNC: sistema nervioso central; ABC: abacavir; AZT: zidovudina; 3TC: lamivudina; TDF: tenofovir; FTC: emtricitabina; EFV: efavirenz; NVP: nevirapina; LOP/r: lopinavir-ritonavir; ATV: atazanavir; DDI: didanosina; FPV: fosamprenavir; DRV: darunavir; RAL: raltegravir; TB: tuberculosis; VHC: infección virus de hepatitis C; Tto: tratamiento; IRC: insuficiencia renal crónica.

ANÁLISIS

Los primeros años de la implementación del tratamiento antirretroviral en pacientes con VIH estaban opacados por el gran número de tabletas o los efectos tóxicos que se presentaban [19-21], predominaba su eficacia sobre la toxicidad o dificultad de

posología; y solo se cambiaba el medicamento cuando se presentaba un fracaso virológico, teniendo pocas opciones de cambio y sin conocer o no tener un adecuado estudio del éxito de la combinación de medicamentos en los esquemas existentes [22]. Con el transcurso de los años, y el avance de la tecnología, se lograron desarrollar nuevos medicamentos con mejor tolerabilidad, algunos más eficaces, o con menos número de tabletas para el día. Al cambiar los medicamentos se reportó que los pacientes apreciaban una mejoría en su calidad de vida al cambiar los anteriores esquemas que ya habían desarrollado toxicidad en su organismo [23].

Para el momento del estudio (2017) en la ciudad de Bogotá se encontraban con diagnóstico de VIH 19743 personas [24], lo que representa que el programa de atención CEPAIN atiende el 23% de la población de la ciudad capital del país, contando con un número importante de pacientes en atención, con lo cual los resultados del presente estudio pueden reflejar situaciones de vida real de centros de salud semejantes. La proporción entre hombres y mujeres que presentan cambios a los esquemas antirretrovirales es similar si se compara en base al número de pacientes de cada género en el total de pacientes del programa, siendo el 2017 el único año en el que se presentó más cambios de TAR en las mujeres que en los hombres; los rangos etáreos donde se encontró mayor número de cambios de tratamiento antirretroviral para hombres se registraron entre los 30 a 39 años, y en los 40 a 49 años para mujeres.

En Colombia, la Cuenta de Alto Costo de VIH (CAC) es el organismo encargado de la recolección, validación y análisis de la información correspondiente a las enfermedades de alto costo del país, por lo cual la comparación de nuestros resultados con el comportamiento en el país permitió evaluar la tendencia en resultados de las decisiones de los profesionales que realizan la atención en el programa. Para el 2017, la CAC reportó que a nivel nacional las causas de cambios de medicamentos antirretrovirales se dieron en un 27% por intolerancia, efectos secundarios o interacciones medicamentosas, 15% por fracaso (terapéutico, virológico, o inmunológico), y refirió que un 4% de los cambios fueron para facilitar la adherencia.

Los resultados de nuestro grupo de estudio en población con VIH evidenciaron que las principales causas del cambio de tratamiento antirretroviral en el periodo de estudio fueron: 49% por reacciones adversas a los medicamentos en un, 23% para simplificación, y 19% por fallo terapéutico; encontrando así en comparación al país que el cambio por fracaso de efectividad a los medicamentos ocupa el último lugar, y emerge un mayor porcentaje de la simplificación de los esquemas buscando mejorar la adherencia de los pacientes.

Con los datos clínicos de los pacientes a quienes se les había realizado cambio de medicación por reacción adversa se realizó una clasificación por órgano o sistema afectado,

se encontró que las reacciones más reportadas eran metabólicas, en sistema nervioso central, gastrointestinales y dermatológicas; específicamente, las principales fueron: intolerancia gastrointestinal (diarrea, distensión abdominal, reflujo, náuseas, emesis), alteraciones del ánimo, lipodistrofia, dislipidemia y rash. Los medicamentos que presentaron mayor porcentaje de reacciones adversas fueron didanosina, lopinavir, atazanavir, efavirenz y zidovudina; también se evidenció una disminución del porcentaje de eventos secundarios asociados a la zidovudina en los años 2016 y 2017, debido a que los esquemas con este antirretroviral fueron menos formulados, así como la erradicación de didanosina para el 2016 y el 2017.

Por otro lado, en el grupo de cambio por simplificación se midió la efectividad del tratamiento antirretroviral a las 8 semanas después del cambio, observando porcentajes de supresión virológica superior al 90% en el periodo del 2015-2017.

Un hallazgo importante del presente estudio se centró en las causas de cambio de tratamiento de manera temprana (antes de los doce meses de tratamiento), se detectó un comportamiento similar al de la población total del estudio siendo la mayor causa de cambio las reacciones adversas a medicamentos, 70%, seguido por simplificación 22% y por fallo terapéutico 10%; otras causas de cambio de tratamiento no menos importantes en el periodo de estudio fueron las interacciones medicamentosas y las comorbilidades.

Comparado con otros estudios de grupos de atención en VIH en Latinoamérica se observa que Bandeira *et al.* [15] en Brasil reportan, al igual que nuestros resultados, que los efectos secundarios fueron el motivo por el que más se cambió el esquema antirretroviral, pero en una proporción mayor, 70% vs. 49% registrado en nuestro estudio. La prevalencia diferente de medicamentos que han sido cambiados puede estar relacionada con el cambio de lineamientos de tratamiento en esa región, ya que el efavirenz fue el medicamento más cambiado, seguido de tenofovir, zidovudina y lopinavir/ritonavir.

En otras regiones los motivos de cambio varían, pero la simplificación es la causa más frecuente [25]. Esta posiblemente se relaciona con el lanzamiento al mercado de medicamentos con menor toxicidad, con requerimiento de menos tabletas al día o menores restricciones dietarias, incluso entre pacientes con líneas avanzadas de tratamiento.

Sin embargo, en nuestro país se debe tener en cuenta que el costo creciente de los medicamentos antirretrovirales aumenta el gasto del tratamiento en pacientes con VIH, y que en los cambios de tratamiento puede haber una variación considerable del valor, no solo de manejo sino de seguimiento. Con lo anterior, se debe evaluar constantemente la dinámica que tendrá la fabricación de nuevos antirretrovirales, y la aplicación en la transición a los países con diferentes ingresos per cápita [26].

Por otro lado, un factor que se debe evaluar es la disminución de opciones que causan todos los cambios, con la disminución en los medicamentos disponibles por grupo de acción para futuras opciones farmacológicas. Además, debe estimarse que la cronicidad de la infección ha prolongado el uso de todos los tratamientos, y ante la variabilidad de las estrategias terapéuticas y el tiempo de exposición aún no se conoce la durabilidad en la práctica clínica de los medicamentos más recientes, además a largo plazo con el aumento de una población envejecida en manejo con TAR, esto implicaría una sobrecarga en los sistemas de salud que tienen que garantizar un enfoque clínico y económico sustentable [27].

CONCLUSIONES

El uso de los medicamentos antirretrovirales ha llevado a que su elección posterior a la primera línea farmacológica recomendada por las guías científicas sea de gran complejidad, porque las decisiones en los cambios de tratamiento antirretroviral derivadas de la introducción de nuevos medicamentos tienden a reducir el número de tabletas en los esquemas, además tienen distintos perfiles de eficacia, tolerancia, tipos de efectos secundarios, menor toxicidad, barrera genética, tropismo e interacciones.

Teniendo en cuenta que los efectos adversos se encuentran entre los factores que afectan la adherencia al tratamiento antirretroviral es necesario tomar decisiones terapéuticas que tengan en cuenta la optimización del tratamiento, para evitar que el paciente deje su medicación. E incluso en los casos de fracaso virológico y simplificación se debe tener un grado de evaluación diferente, que procure un equilibrio con la realidad del sistema de salud del país valorando también el costo creciente de los medicamentos antirretrovirales, la dinámica en la transición y aplicación de los nuevos esquemas para garantizar un enfoque clínico y económico sustentable, y así optimizar el tratamiento y evitar la falla terapéutica en el paciente.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. H. Samji, A. Cescon, R.S. Hogg, S.P. Modur, K.N. Althoff, K. Buchacz *et al.*, Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada, *PLoS One*, **8**(12), e81355 (2013).

2. K. Meir-Shafrit, S. Pollack, Accelerated Aging in HIV Patients, *Rambam Maimonides Med. J.*, **3**(4), e0025 (2012).
3. D. Vanegas-Otálvaro, L. Acevedo-Sáenz, F.J. Díaz-Castrillón, P.A. Velilla-Hernández, Resistencia a antirretrovirales: bases moleculares e implicaciones farmacológicas, *Rev. CES Med.*, **28**(1), 91-106 (2014).
4. J.L. Martínez-Cajas, H.F. Mueses-Marín, P. Galindo-Orrego, J.F. Agudelo, J. Galindo-Quintero, HIV drug resistance in ART-experienced patients in Cali, Colombia, 2008-2010, *Biomédica*, **33**(4), 631-642 (2013).
5. Ministerio de Salud y Protección Social, *Guía de práctica clínica (GPC) basada en la evidencia científica para la atención de la infección por VIH/Sida en adolescentes (con 13 años de edad o más) y adultos*, GPC-2014- Guía completa GPC-2014-39, Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA). Bogotá, Colombia, diciembre de 2014. ISBN: 978-958-8735-92-4.
6. A. Carr, D.A. Cooper, Adverse effects of antiretroviral therapy, *Lancet*, **356**(9239), 1423-1430 (2000).
7. V. Montessori, N. Press, M. Harris, L. Akagi, J.S. Montaner, Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection, *CMAJ*, **170**(2), 229-238 (2004).
8. D. Nolan, P. Reiss, S. Mallal, Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection: a review of selected topics, *Expert Opin. Drug Saf.*, **4**(2), 201-218 (2005).
9. M.J. Galindo-Puerto, M.A. De Miguel, B. Roca, M.J. Téllez, R. Blázquez, La comorbilidad como factor limitante del TARGA, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **24**(Suppl. 2), 1-12 (2006).
10. J. Astuvilca, Y. Arce-Villavicencio, R. Sotelo, J. Quispe, R. Guillén, L. Peralta, J. Huaranga, C. Gutiérrez, Incidencia y factores asociados con las reacciones adversas del tratamiento antirretroviral inicial en pacientes con VIH, *Rev. Peruana Med. Exp. Salud Pública*, **24**(3), 218-224 (2007).
11. D. Hernández, J. Pérez, Causas de cambio de tratamiento en un grupo de pacientes VIH/SIDA cubanos, *Rev. Cubana Invest. Bioméd.*, **29**(2), 223-228 (2010).
12. D.N. Ankrah, M. Lartey, A.K. Mantel-Teeuwisse, H.G. Leufkens, Five-year trends in treatment changes in an adult cohort of HIV/AIDS patients in Ghana: a retrospective cohort study, *BMC Infect Dis.*, **17**(1), 664 (2017).

13. L. Gratacòs, M. Tuset, C. Codina, J.M. Miró, J. Mallolas, N. Miserachs *et al.*, Tratamiento antirretroviral de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana: duración y motivos de cambio del primer esquema terapéutico en 518 pacientes, *Medicina Clínica*, **126**, 241-245 (2006).
14. E. Pedrol, P. Viciano, A. Arranz, J. Pasquau, E. Deig, M. Tacias, Causas que justifican el cambio del tratamiento antirretroviral en personas con infección por el VIH en España (años 2010-2011). Estudio SWITCH AUDIT, *Rev. Esp. Quimioter.*, **27**(2), 93-97 (2014).
15. A. Bandeira, D.B. Elias, M.G. Cavalcante, D.G. Lima, L. Tavora, Antiretroviral changes during the first year of therapy, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, **63**(7), 606-612 (2017).
16. A.B. Unsal, A. Mattingly, S. Jones, J. Purdy, J. Reynolds, J. Kopp *et al.*, Effect of antiretroviral therapy on bone and renal health in young adults infected with HIV in early life, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **102**(8), 2896-2904 (2017).
17. H. Kovari, C. Sabin, B. Ledergerber, L. Ryom, P. Reiss, M. Law *et al.*, Antiretroviral drugs and risk of chronic alanine aminotransferase elevation in human immunodeficiency virus (HIV)-monoinfected persons: The data collection on adverse events of anti-HIV drugs study, *Open Forum Infect. Dis.*, **3**(1), ofw009 (2016).
18. E.J. Dziuban, E. Raizes, E.H. Koumans, A farewell to didanosine: harm reduction and cost savings by eliminating use of didanosine, *Int. J. STD AIDS*, **26**(12), 903-906 (2015).
19. W. Lewis, B. Day, W. Copeland, Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**(10), 812-822 (2003).
20. A. Boulle, C. Orrel, R. Kaplan, G. Van Cutsem, M. McNally, K. Hilderbrand *et al.*, Substitutions due to antiretroviral toxicity or contraindication in the first 3 years of antiretroviral therapy in a large South African cohort, *Antivir. Ther.*, **12**(5), 753-760 (2007).
21. F. Fornia, C. Liechty, P. Solberg, F. Asiimwe, W. Were, J. Mermin *et al.*, Clinical toxicity of highly active antiretroviral therapy in a home-based AIDS care program in rural Uganda, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **44**(4), 456-462 (2007).

22. E. Humphreys, L. Hernandez, G. Rutherford, Antiretroviral regimens for patients with HIV who fail first-line antiretroviral therapy, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **4**, Cd006517 (2007).
23. H. Drechsler, W. Powderly, Switching effective antiretroviral therapy: a review, *Clin. Infect. Dis.*, **35**(10), 1219-1230 (2002).
24. Cuenta de Alto Costo, Situación del VIH en Colombia, URL: <http://www.cuentadealtocosto.org/>, consultado el 31 de julio de 2018.
25. J. Nachega, M. Mugavero, M. Zeier, M. Vitoria, J.E. Gallant, Treatment simplification in HIV-infected adults as a strategy to prevent toxicity, improve adherence, quality of life and decrease healthcare costs, *Patient Prefer. Adherence*, **5**, 357-367 (2011).
26. C. Malati, J. Rosenfeld, S. Mowafy, T. Rittmiller, J. Kuritsky, J. Crowley, Dealing with large-scale supply lines when introducing new regimens, *Curr. Opin. HIV AIDS*, **12**(4), 408-413 (2017).
27. A. Chawla, C. Wang, C. Patton, M. Murray, Y. Punekar, A. de Ruiter *et al.*, A review of long-term toxicity of antiretroviral treatment regimens and implications for an aging population, *Infect. Dis. Ther.*, **7**(2), 183-195 (2018).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L. Arévalo-Mora, S. Moscoso, A. Acosta, M. Mantilla, Complejidad de la transición de los esquemas antirretrovirales en un programa de atención de VIH en Bogotá durante el periodo de 2015 a 2017, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 505-520 (2019).

Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela

Franklin Pacheco-Coello^{1,2*}, Doralys Ramírez-Azuaje¹, Ibis Pinto-Catari¹, María Peraza-Marrero¹, Corymar Orosco-Vargas¹

¹Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos, Universidad de Carabobo, Escuela de Bioanálisis, Sede Aragua, Calle Ruíz Pineda, La Morita II, Sector Santa Rita, estado Aragua, Venezuela, Código Postal 2103.

²Laboratorio de Química y Análisis Instrumental, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Carabobo, Escuela de Bioanálisis, Sede Aragua, Calle Ruíz Pineda, La Morita II, Sector Santa Rita, estado Aragua, Venezuela, Código Postal 2103.

*Correo electrónico: pachecofranklin74@gmail.com

Recibido para evaluación: 7 de marzo de 2019

Aceptado para publicación: 17 de julio de 2019

RESUMEN

El fácil acceso y preparación de bebidas a base de *Hibiscus sabdariffa* L. representa una alternativa en el tratamiento de enfermedades crónicas y degenerativas. El estudio tuvo como objetivo comparar la contracción de fenoles totales y flavonoides en cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., de una marca comercial y otra sin permiso sanitario. Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu y método colorimétrico de Marinova para flavonoides. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la concentración de fenoles totales y flavonoides. Estos resultados demuestran que existen factores que condicionan el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y otros compuestos bioactivos.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa* L., polifenoles, flavonoides.

SUMMARY

Comparison of total phenolic compounds in *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela

The easy access and preparation of drinks based on *Hibiscus sabdariffa* L. represents an alternative in the treatment of chronic and degenerative diseases. The objective of the study was to compare the contraction of total phenols and flavonoids in calices of *Hibiscus sabdariffa* L., of one commercial brand and another without sanitary

permission. For the determination of total phenols, the Folin-Ciocalteu method and the Marinova colorimetric method for flavonoids were used. A statistically significant difference ($p < 0.05$) was found in the concentration of total phenols and flavonoids. These results show that there are factors that condition the content of phenolic compounds, flavonoids in chalice and other bioactive compounds.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., polyphenols, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Hibiscus sabdariffa L., o tradicionalmente conocida en Venezuela y varias partes de Latinoamérica como flor de Jamaica, es una planta anual cultivada en los climas tropicales y subtropicales del mundo. La calidad del material vegetal se determina de acuerdo a diversos factores: las condiciones locales de cultivo, el tiempo de cosecha, el manejo poscosecha y, sobre todo, la etapa de secado [1]. Diversos estudios demuestran la presencia de polifenoles en los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., como flavonoides y antocianinas [2]. Este grupo de compuestos reportan múltiples efectos biológicos, tales como: actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica, antimicrobiana, antiperoxidación lipídica, antialérgico, anticancerígena, vasodilatadores, así como la capacidad para neutralizar las especies reactivas de nitrógeno [3, 4].

Los polifenoles son utilizados en el campo nutricional, la industria agrícola, cosmética y de alimentos, representando el mayor consumo de antioxidantes en la dieta de humanos, con una alta implicación en la salud pública [5, 6]. Los compuestos polifenólicos son un grupo cercano a 8000 sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura. Entre los más importantes están los flavonoides, que poseen una estructura básica C6-C3-C6, como las antocianinas, catequinas y epicatequinas [7-9].

Al ser *Hibiscus sabdariffa* L., una de las plantas más empleadas en el mundo por sus diversas propiedades y beneficios a la salud, el presente estudio tuvo como objetivo comparar el contenido de fenoles totales y flavonoides, en extractos acuosos de cálices con y sin registro comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal sin registro comercial fue obtenido en dos mercados populares de la ciudad de Caracas D.C. (coordenadas geográficas: 10° 30' 00" N, 66° 56' 00" W), cultivado por agricultores independientes en la ciudad de los Teques, estado Miranda (coordenadas geográficas: 10° 15' 02" N, 66° 25' 38" W).

Para la comparación de compuestos bioactivos se emplearon cálices de una marca comercial (McCormick).

Extracción los extractos acuosos de cálices comerciales y no comerciales

Los extractos se prepararon con 2,5 g de cálices secos y 100 mL de agua destilada. Se dejó hervir por 15 min, luego se separó el líquido de los cálices por decantación y la extracción se repitió en las mismas condiciones. Los extractos se filtraron con papel Whatman N.º. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada [10].

Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. 50 μ L de muestra fueron adicionados a 125 μ L del reactivo de Folin, y 400 μ L de carbonato de sodio 7,1% (p/v), completándose con agua destilada hasta 1 mL. Este procedimiento se realizó por quintuplicado. Seguidamente se prepararon 5 patrones de concentración de 50, 100, 150, 200 y 250 μ g/mL, a partir de una solución patrón madre de ácido gálico (fenol) de concentración 500 μ g/mL. Por último, se realizó la lectura a 760 nm empleando el equipo de absorción molecular Génesis 20 (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como mg de GAE/g de material vegetal [11].

Determinación de flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó siguiendo un método colorimétrico. 100 μ L de muestra fueron mezclados con 30 μ L de NaNO_2 al 5% (p/v), 30 μ L de AlCl_3 10% (p/v), 200 μ L de NaOH a 1M y ajustados con agua destilada hasta un volumen final de 1000 μ L, después se realizó la lectura espectrofotométrica a 510 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar (+)-catequina. Los resultados fueron expresados como mg de catequina equivalente/g de material vegetal [12].

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por quintuplicados y se expresaron los valores como los promedios \pm desviación estándar (DE). Para comparar ambos extractos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), usando el programa Statistix 9.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado las propiedades benéficas que tiene *Hibiscus sabdariffa* L., por lo que la elaboración de productos a base de sus cálices es una gran alternativa para la industria de alimentos y bebidas, principalmente, en el sector de los denominados alimentos funcionales. Este sector ha tenido un aumento muy importante en el mercado mundial [13].

En la tabla 1 se muestra la concentración de los extractos de cálices con y sin registro comercial, hallándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferencia puede deberse a que existen varios factores internos y externos que afectan la calidad y cantidad de los compuestos fenólicos en las plantas, como la diversidad genética (variedad y origen de la muestra), etapa de madurez, variables ambientales (intensidad de la luz, clima, temperatura, uso de fertilizantes) [10].

En Costa Rica evaluaron el contenido de compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides) de 4 marcas comerciales. Los investigadores concluyen que, en el mercado costarricense, el perfil en compuestos fenólicos de las tisanas varía de acuerdo con el productor, por lo que el consumidor que busca algún efecto beneficioso para su salud a través del consumo de bebidas de rosa de Jamaica obtendrá resultados diferentes de acuerdo con la marca del producto que consuma [14]. Los resultados también coinciden con lo encontrado por varios autores que destacan la presencia de fenoles totales en mayor concentración en aquellos extractos de cálices comerciales y colores diversos [15-17].

Tabla 1. Concentración de fenoles totales (mg de GAE/g de material vegetal).

| Material vegetal | Media | DE | <i>p</i> |
|------------------|-------|-------|----------|
| Cálices (CRC) | 10,3 | ±0,51 | |
| Cálices (SRC) | 6,1 | ±0,49 | 0,037* |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; CRC: con registro comercial; SRC: sin registro comercial.

*Significativo $p < 0,05$.

En lo que respecta a la cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos, se evidenció una diferencia significativa ($p < 0,05$) (ver tabla 2). Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Estos son considerados agentes antioxidantes, lo que sugiere un uso potencial de estos extractos para el tratamiento de diferentes patologías como aterosclerosis, procesos antiinflamatorios, anticancerígenos y para reducir los niveles de colesterol [13]. Por otro lado, algunos estudios describen a los flavonoides como eficaces agentes quimiopreventivos, inhibición de la carcinogénesis *in vitro* y, además, hay pruebas fehacientes de que también lo hacen *in vivo* [18, 19].

Otros estudios han demostrado que los flavonoides poseen actividad antibacteriana observadas en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulence*, y *Klebsiella pneumoniae* [1-20]. Estas investigaciones permiten proyectar a *Hibiscus sabdariffa* L. como una valiosa alternativa en el consumo de estos compuestos bioactivos.

Tabla 2. Concentración de flavonoides (mg de catequina equivalente/g de material vegetal).

| Material vegetal | Media | DE | <i>p</i> |
|------------------|-------|-------|----------|
| Cálices (CRC) | 6,3 | ±0,21 | |
| Cálices (SRC) | 3,1 | ±0,19 | 0,041* |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; CRC: con registro comercial; SRC: sin registro comercial.

*Significativo $p < 0,05$.

CONCLUSIONES

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., con y sin registro comercial, proporcionan una fuente importante de polifenoles y flavonoides. Es necesario estimular a las empresas para que en sus productos a base de *Hibiscus sabdariffa* L. expresen el contenido y concentración de estos compuestos bioactivos, al igual que sus beneficios para la salud.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Centro de Estudio en Salud de los Trabajadores (CEST-UC) de la Universidad de Carabobo, Maracay, estado Aragua.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. L. Vivas, *Control de calidad de Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): estudio farmacobotánico, análisis de polifenoles y actividad antioxidante aplicables en un laboratorio de baja complejidad, Tesis de Maestría, Universidad de Buenos Aires, 2014, pp. 35.
2. R. Márquez, C. de la Rosa, C. Augusto, M. Medina, Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad, *Wistar. Scientia et Technica*, **8**(33), 377-381 (2007).
3. G. Gradinaru, C.G. Biliaderis, S. Kallithraka, P. Kefalas, C. Garcia-Viguera, Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition, *Food Chem.*, **83**(3), 423-436 (2003).

4. E. Ordoñez-Gómez, D. Reátegui-Díaz, J. Villanueva-Tiburcio, Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos, *Scientia Agropecuaria*, **9**(1), 113-121 (2018).
5. S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant polyphenols: chemical properties biological activities, and synthesis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 586-621 (2011).
6. P. Ninfali, G. Mea, S. Giorgini, M. Rocchi, M. Bacchiocca, Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition, *Br. J. Nutr.*, **93**, 257-266 (2005).
7. C. Gaviria, C. Ochoa, N. Sánchez, C. Medina, M. Lobo, P. Galeano, Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw), *Bol. Latinoamer. Caribe Plantas Med. Aromat.*, **8**, 519-528 (2005).
8. R.B. Choksi, W.H. Boylston, J.P. Rabek, W.R. Widger, J. Papaconstantinou, Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1688**, 95-101 (2004).
9. B. Rojano, K. Zapata, F. Cortés, Capacidad atrapadora de radicales libres de *Pasiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (curuba), *Rev. Cubana Plantas Med.*, **17**, 408-419 (2012).
10. A. Reyes-Luengas, Y. Salinas-Moreno, M. Ovando-Cruz, R. Arteaga-Garibay, Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos, *Agrociencia.*, **49**, 277-290 (2015).
11. V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.*, **16**(3), 144-158 (1965).
12. D. Marinova, F. Ribarova, M. Atanassova, Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables, *J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy*, **40**(3), 255-260 (2005).
13. S. Cid-Ortega, J.A. Guerrero-Beltrán, Propiedades funcionales de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **6**(2), 47-63 (2012).
14. M. Agüero, C. Segura Parra, Análisis comparativo de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de cuatro marcas de tisanas de *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*) comercializadas en Costa Rica, *Uniciencia*, **28**(1), 34-42 (2014).

15. P. Verma, A. Verma, Evaluation of antibacterial activity of different parts of *Tagetes erecta*, *Int. J. Pharm. Life Sci.*, **3**(6), 1766-1768 (2012).
16. K. Christian, C. Jackson, Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity, *J. Food Compos. Ann.*, **22**, 663-667 (2009).
17. D. Pérez, Y. Ortiz, Determinación de la capacidad antioxidante de bebidas de flor de Jamaica y tamarindo, *Rev. Cienc. Tecnol. Alimen.*, **21**(1), 31-33 (2011).
18. S. Caltagirone, C. Rossi, A. Poggi, F.O. Ranelletti, P.G. Natali, M. Brunetti, F.B. Aiello, M. Piantelli, Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential, *Int. J. Cancer*, **87**, 595-600 (2000).
19. Y. Miyagi, A.S. Om, K.M. Chee, M.R. Bennink, Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice, *Nutrition and Cancer*, **36**, 224-229 (2000).
20. R. Ramya, S. Mahna, S. Bhanumathi, S. Bhat, Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic activity of *Tagetes* spp, *Int. Res. J. Pharm.*, **3**(11), 114-116 (2012).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

F. Pacheco-Coello, D. Ramírez-Azuaje, I. Pinto-Catari, M. Peraza-Marrero, C. Orosco-Vargas, Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 521-527 (2019).

Thermodynamic analysis of celecoxib in amphiprotic and amphiprotic-aprotic solvent mixtures at several temperatures

M. Ángeles Peña*, Begoña Escalera, Norma Torres

Unidad Docente de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain.

*E-mail: angeles.pena@uah.es

Received: July 15, 2019

Accepted: July 25, 2019

SUMMARY

The solubilities of celecoxib (CLX), a COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drug, were determined in water-ethanol and ethanol-ethyl acetate mixtures at several temperatures (288.15-308.15 K). The solubility curves as a function of ethanol ratio were studied at five temperatures, they showed a single maximum located at 50% ethanol-ethyl acetate ($\delta_1 = 22.50 \text{ MPa}^{1/2}$). The measurements of the variation of inherent drug solubility with temperature were used to estimate different thermodynamic parameters, enthalpy, entropy and Gibbs free energy of solution (ΔH^S , ΔS^S and ΔG_{lm}^S , respectively). The apparent enthalpies of the solution were a nonlinear function of the ethanol ratio in aqueous mixture. Non-linear enthalpy-entropy compensation analysis was observed indicating different dissolution mechanism with the variation in mixtures composition. The solubility enhancement is entropy driven at water-rich region (0-40% v/v ethanol) and enthalpy controlled at ethanol-rich region (40-100% v/v ethanol), likely due to water-structure loss around nonpolar moieties of the drug and for the ethanol-rich mixtures it is the enthalpy, probably due to the drug better solvation.

Key words: celecoxib, solubility, solvent mixtures, thermodynamic quantities, characterization.

RESUMEN

Análisis termodinámico del celecoxib en mezclas disolventes anfipróticas y anfipróticas-apróticas a varias temperaturas

Se determinó la solubilidad del celecoxib (CLX), un fármaco antiinflamatorio no esteroide selectivo de COX-2, en agua-etanol y etanol-acetato de etilo a varias temperaturas (288,15-308,15 K). Los perfiles de solubilidad obtenidos fueron estudiados en función de la proporción de etanol en las cinco temperaturas de estudio. Los resultados muestran solamente un máximo en el 50% de etanol-acetato de etilo ($\delta_1 = 22,50 \text{ MPa}^{1/2}$). La variación de la solubilidad con la temperatura se utilizó para calcular diferentes parámetros termodinámicos, entalpía, entropía y energía de disolución libre de Gibbs (ΔH^s , ΔS^s y ΔG^s_{lim} , respectivamente). Las entalpías aparentes de disolución fueron no lineales en la mezcla acuosa. Además, se observó un análisis de compensación de entalpía-entropía no lineal, lo que indica un mecanismo de disolución que varía con la composición de cada mezcla. El aumento de la solubilidad es impulsado por la entropía en la región rica en agua (0-40% v/v de etanol) y la entalpía en la región rica en etanol (40-100% v/v de etanol), probablemente debido a la pérdida de la estructura del agua alrededor de los residuos no polares del fármaco y para las mezclas ricas en etanol es la entalpía, probablemente debido a la mejor solvatación del fármaco.

Palabras clave: celecoxib, solubilidad, mezcla disolvente, parámetros termodinámicos, caracterización.

INTRODUCCIÓN

Celecoxib (CLX, chemical name: 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide, CAS number: 184007-95-2, formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, molar mass: $381.37 \text{ g mol}^{-1}$, molecular structure shown in figure 1) is a COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drug, widely used in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, familial adenomatous polyposis and acute pain. When CLX is co-administrated with chemotropic agents in cancer treatment protocols, it has shown preventive activity in colon carcinogenesis, ultraviolet B radiation (UVB) induced skin cancer and breast cancer. CLX can be categorized as class II drugs (poor solubility in water and high gastrointestinal permeability) [1-3].

Solubility analysis of drug molecules in solvent mixtures is becoming increasingly important in the chemical industry of drug design and manufacture. The solubility range comprised among 288.15-308.15 K, it is particularly important because it includes the physiological temperature and temperature changes that are the most usual during storage

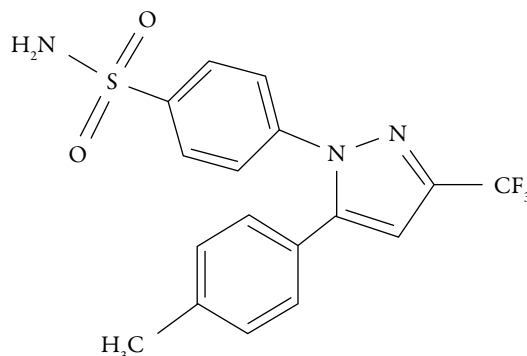


Figure 1. Chemical structure of CLX.

to prevent precipitation of the solute. Ethanol-water and ethanol-ethyl acetate mixtures cover a wide range of the solubility parameter scale from ethyl acetate ($\delta_1 = 18.48 \text{ MPa}^{1/2}$) to water ($\delta_1 = 47.86 \text{ MPa}^{1/2}$) and have been used to study the solubility behaviour in a relatively wide polarity range and to determine the solubility parameters of solid solutes [4-7].

In this paper the solubilities of CLX have been measured between 288.15 K and 308.15 K, to extend the database on experimental solubility for CLX, and as well, to evaluate the effect of the cosolvent composition on solubility and dissolution thermodynamics of CLX in both mixtures solvents. To study the influence of cosolvents, it has been used thermodynamic relationships with some other drugs and cosolvent systems [8-11].

The thermodynamic magnitudes of solution and transfer were obtained to corroborate earlier findings about whether enthalpy-entropy compensation is a general effect for the solubility of drugs in solvent mixtures.

MATERIALS AND METHODS

Materials

CLX was supplied from Laboratorios Normon (Madrid, Spain; with purity of at least 0.990 in mass fraction) it was used as received. All solvents used were of analytical grade. Binary compositions were prepared by volume, 0-100% water - ethanol (Panreac, Monplet, Barcelona, Spain, ethanol absolute, CAS N° 64-17-5) and 0-100 % ethanol-ethyl acetate (Panreac, Monplet, Barcelona, Spain, 99.5%, CAS N° 141-78-6), using double distilled water and Durapore® filters (0.45 μm , Millipore Corp; Darmstadt, Germany).

Methods

Solubility determination

Stoppered glass flasks were prepared adding a small excess of solute to the solvent mixtures, then they were placed into a thermostated bath ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) (HETO® Type SBD50-1 bio. 501828H, Paris, France) shaking continuously at constant highest temperature to obtain the equilibrium of solubility. Furthermore, ultrasonic bath (Branson® B-3200E. C119/86, Urdorf, Switzerland) was used to accelerate the process to attain the saturation. Previously, the dissolution curves of amount dissolved versus time were created to identify the time necessary to achieve the equilibrium in water, ethanol and ethyl acetate (8-10 days).

Once reached the equilibrium, samples of the saturated solutions were filtered (Durapore® membranes 0.45 mm pore size; Darmstadt, Germany) and diluted with ethanol absolute. The concentrations were determined in a single beam spectrophotometer (Agilent® 61030AX, CA, United States) at $\lambda_{\text{max}}=253$ nm. The densities of the solutions were measured at each temperature in 10-mL pycnometers, to convert the molar solubility into mole fraction units. All the experimental results were the average of at least three replicated experiments, with a coefficient of variation [$\text{CV} = (\text{SDX}_2/\text{X}_2)\times 100$] lower than 5% except in a few measures that were underestimated.

Differential scanning calorimetry (DSC)

The heat and temperature of fusion were measured from differential scanning calorimetry, DSC, (DSC 3 Mettler Toledo, Spain) operating with software version StarE 14. The analysis was performed at a heating rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$, from 30°C to 300°C , under nitrogen flow ($20\text{ mL}/\text{min}$). Samples were accurately weighed (about 3 mg) into aluminium pan and then the pan was sealed with a corresponding lid. The DSC analysis was performed on the original powders and on several solid phases at equilibrium with their cosolvent mixtures ratios at the lowest temperature. The solid phases were retained on filter papers and the solvent excess was evaporated at room temperature until constant weight to avoid alterations or induce polymorphic changes. The equipment was calibrated using indium as standard [12].

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Fourier transform IR spectra (FTIR) were examined over the scanning range of $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ using a Spectrum 2000 spectrometer (Perkin Elmer, CT, United States). The resolution was 1 cm^{-1} . The spectra were recorded for CLX and for the same solid phase at equilibrium selected for DSC with their cosolvent-ethanol ratios at the lowest temperature. Samples of around 3 mg were mixed with 297 mg of potassium bromide

and gently ground in an agate mortar. The samples were analysed from disks of about 5 mm diameter prepared with potassium bromide and compressed in a hydrostatic press at a force of 10 T for 10 secs.

RESULTS AND DISCUSSION

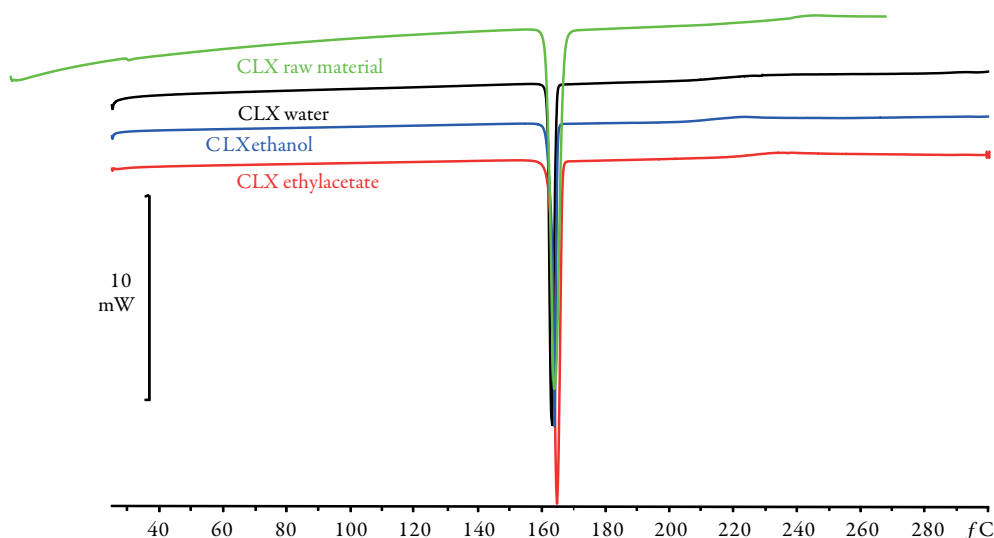
Characterization of the solid state and solubility properties of the original powders: DSC and FTIR studies

All characterization studies were performed in triplicate. Original powder shows an only endothermic effect related to melting point (see table 1, figure 2). The onset and the heat of fusion of single event of CLX Form I were $T^f=162.68$ °C and $\Delta H^f=98.64$ J/g. The flat baseline suggested that no phase transitions or excess solvent content was present prior to initial melting. This agrees with previous published results [13]. In this work the onset is used because it is not influenced by mass. The thermograms of the solid phase after equilibrium with the saturated solutions did not differ from that found for the original powder, in all cases, exhibiting curves similar to crystalline celecoxib with identical values of melting points and heats of fusion. It is observed an identical profile indicating solvent mixtures do not induce solid phase changes such as polymorphism or solvates. The literature makes broad reference to polymorphism for CLX [8, 14-15]. It has been identified several polymorphic forms called Forms I, II and III whose melting points are 163.0 °C, 161.5 °C and 160.9 °C, respectively. Form III is a thermodynamically stable crystal at ambient conditions. A new solid form (Form IV) of CLX was prepared in the presence of Polysorbate 80 and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) [16], with an onset at 145-148 °C, which was around 12-15 °C less than the identified melting points of Forms I, II and III. On the other hand, it has been observed the relation between molecular mobility and tendency of the amorphous celecoxib to recrystallize. Grzybowska *et al.* [17] show that the structural relaxation seems to be responsible for devitrification of celecoxib if stored at room temperature (293 K). It exists a large interest in controlling crystallization in the pharmaceutical industry.

FTIR spectroscopies allowed exploring the differentiation in molecular conformations for distinguish polymorphic forms. The FT-IR absorption spectrum (see figure 3) conforms to publish CLX Form I with distinctive peaks at 3340 cm^{-1} and 3233 cm^{-1} for the symmetric and asymmetric N-H stretch vibration of the sulphonamide group. The FTIR spectra also showed a characteristic S=O symmetric and asymmetric stretching at 1164 cm^{-1} and 1347 cm^{-1} , respectively [9, 13, 16]. The results observed by FTIR analysis indicates that the solid phases of CLX after equilibrium with each saturated solution in the different solvent mixtures employed remained unchanged; it agreed with the DSC results.

Table 1. Temperature (T^F) and enthalpy of fusion (DH^F) of the CLX and the solid phase equilibrated with saturated solutions in pure solvents.

| Solvent | T^F (°C) | DH^F (J/g) |
|------------------------------|------------|--------------|
| CLX _{Raw Material} | 162.67 | 99.73 |
| CLX _{Water} | 161.55 | 105.41 |
| CLX _{Ethanol} | 162.54 | 97.41 |
| CLX _{Ethyl acetate} | 162.75 | 97.00 |

**Figure 2.** DSC thermograms of CLX and solid phases after equilibrium with pure solvents: water (black), ethanol (blue) and ethyl acetate (red).

Relationship between drug polarity and the solubility profile

The experimental mole fraction solubility is included in tables 2-3 at the temperature range studied (288.15-308.15 K). Figure 4 shows the solubility profiles, as a function of the polarity of the binary liquid systems, expressed by their solubility parameters of Hildebrand (δ_1) and covering a wide polarity range from 18.49 MPa^{1/2} for ethyl acetate to 47.86 MPa^{1/2} for water. Solubility increases with temperature in aqueous and the non-aqueous mixture indicating that the dissolution process is endothermic. CLX exhibits one maximum at $\delta_1 = 22.50$ MPa^{1/2} (50% ethanol in ethyl acetate), this value does not change with temperature. This suggests that the overall polarity is mainly responsible for the solubility changes. Solubility profiles with a single peak (usually in

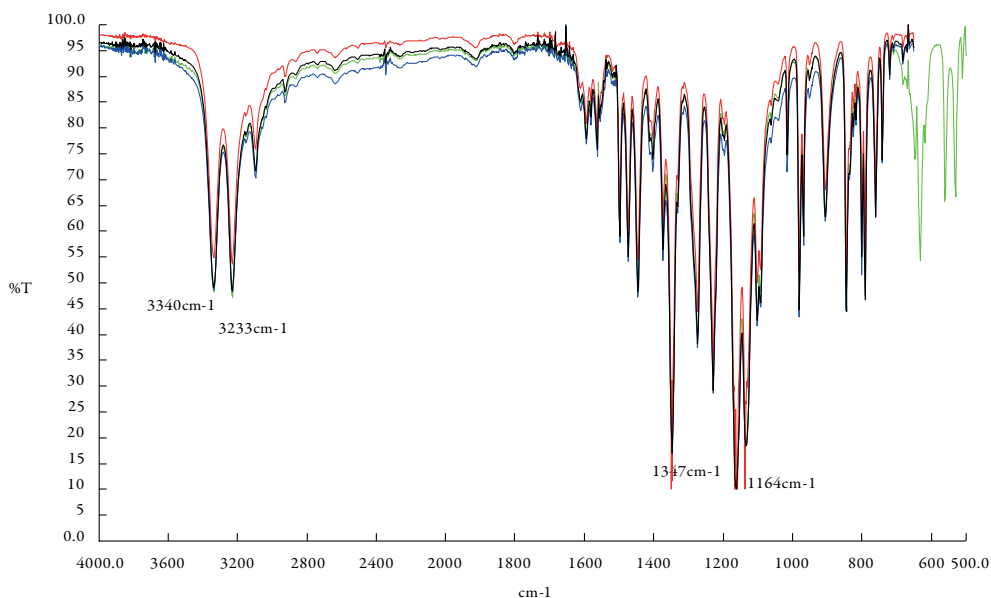


Figure 3. FTIR curves of CLX and solid phases after equilibrium with pure solvents: water (black), ethanol (blue) and ethyl acetate (red).

ethanol-ethyl acetate) were related to less polar drugs with lower solubility parameters [18, 19].

According to the literature, solutes with solubility parameter below $\delta_2=25 \text{ MPa}^{1/2}$ will have only one solubility peak [20]. The solubility parameter of CLX, estimated in accordance with the group contribution methods proposed by Fedors [21] is $\delta_2 = 23.83 \text{ MPa}^{1/2}$, which is slightly greater than the experimental solubility maximum value obtained in this work at $\delta_2 = 22.50 \text{ MPa}^{1/2}$. What is fascinating about this result is that the value is below $25 \text{ MPa}^{1/2}$. Both values do not always correspond, despite this, this theoretical method offers excellent advantages in the stages of pre-formulation of new drug development. Table 4 explain the application of the Fedors method [21] for estimating molar volume and Hildebrand total solubility parameter for CLX calculated according to values reported by Fedors [21].

Apparent heat of solution changes as related to solvent composition

From the solubility data, the thermodynamic functions of solution were calculated. The apparent enthalpy of solution (ΔH^s) and Gibbs free energy of solution (ΔG_{hm}^s) of CLX was obtained from linear regressions of $\ln X_2$ against $T_{hm} = \frac{n}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{T}\right)}$, based on van't

Table 2. Mole fraction solubility of CLX in ethanol + water mixtures at several temperatures and local atmospheric pressure of 950 hPa.

| Cosolvent ^a | 288.15 K | 293.15 K | 298.15 K | 303.15 K | 308.15 K |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0.00 | 1.77×10^{-8} | 2.36×10^{-8} | 2.72×10^{-8} | 3.16×10^{-8} | 3.65×10^{-8} |
| 0.10 | 5.09×10^{-8} | 5.97×10^{-8} | 7.00×10^{-8} | 9.07×10^{-8} | 1.01×10^{-7} |
| 0.20 | 4.71×10^{-7} | 6.41×10^{-7} | 8.17×10^{-7} | 1.12×10^{-6} | 1.37×10^{-6} |
| 0.30 | 1.62×10^{-6} | 1.94×10^{-6} | 2.26×10^{-6} | 2.82×10^{-6} | 3.69×10^{-6} |
| 0.40 | 1.07×10^{-5} | 2.16×10^{-5} | 2.95×10^{-5} | 4.32×10^{-5} | 5.92×10^{-5} |
| 0.50 | 8.63×10^{-5} | 1.24×10^{-4} | 1.60×10^{-4} | 2.23×10^{-4} | 2.93×10^{-4} |
| 0.60 | 3.08×10^{-4} | 4.09×10^{-4} | 5.47×10^{-4} | 7.86×10^{-4} | 1.01×10^{-3} |
| 0.70 | 9.16×10^{-4} | 1.19×10^{-3} | 1.48×10^{-3} | 2.12×10^{-3} | 2.75×10^{-3} |
| 0.80 | 2.10×10^{-3} | 2.79×10^{-3} | 3.62×10^{-3} | 5.16×10^{-3} | 6.76×10^{-3} |
| 0.90 | 5.42×10^{-3} | 6.82×10^{-3} | 8.50×10^{-3} | 1.06×10^{-2} | 1.30×10^{-2} |
| 1.00 | 9.34×10^{-3} | 1.07×10^{-2} | 1.25×10^{-2} | 1.62×10^{-2} | 2.00×10^{-2} |

^a is the volume fraction of ethanol in the ethanol + water mixtures free of CLX.

Table 3. Mole fraction solubility of CLX in ethanol + ethyl acetate mixtures at several temperatures and local atmospheric pressure of 950 hPa.

| Cosolvent ^a | 288.15 K | 293.15 K | 298.15 K | 303.15 K | 308.15 K |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0.00 | 9.34×10^{-3} | 1.07×10^{-2} | 1.25×10^{-2} | 1.62×10^{-2} | 2.00×10^{-2} |
| 0.10 | 1.74×10^{-2} | 2.12×10^{-2} | 2.44×10^{-2} | 3.13×10^{-2} | 3.82×10^{-2} |
| 0.20 | 2.78×10^{-2} | 3.23×10^{-2} | 3.63×10^{-2} | 4.08×10^{-2} | 4.91×10^{-2} |
| 0.30 | 3.58×10^{-2} | 4.02×10^{-2} | 4.53×10^{-2} | 5.38×10^{-2} | 6.18×10^{-2} |
| 0.40 | 4.60×10^{-2} | 5.40×10^{-2} | 5.91×10^{-2} | 7.00×10^{-2} | 8.08×10^{-2} |
| 0.50 | 6.16×10^{-2} | 6.89×10^{-2} | 7.61×10^{-2} | 8.69×10^{-2} | 0.102 |
| 0.60 | 7.04×10^{-2} | 7.60×10^{-2} | 8.42×10^{-2} | 9.59×10^{-2} | 0.109 |
| 0.70 | 7.79×10^{-2} | 8.52×10^{-2} | 9.46×10^{-2} | 0.108 | 0.118 |
| 0.80 | 8.21×10^{-2} | 9.05×10^{-2} | 0.101 | 0.112 | 0.120 |
| 0.90 | 7.90×10^{-2} | 8.88×10^{-2} | 0.100 | 0.114 | 0.126 |
| 1.00 | 7.23×10^{-2} | 8.16×10^{-2} | 8.94×10^{-2} | 9.92×10^{-2} | 0.110 |

^a is the volume fraction of ethyl acetate in the ethanol + ethyl acetate mixtures free of CLX.

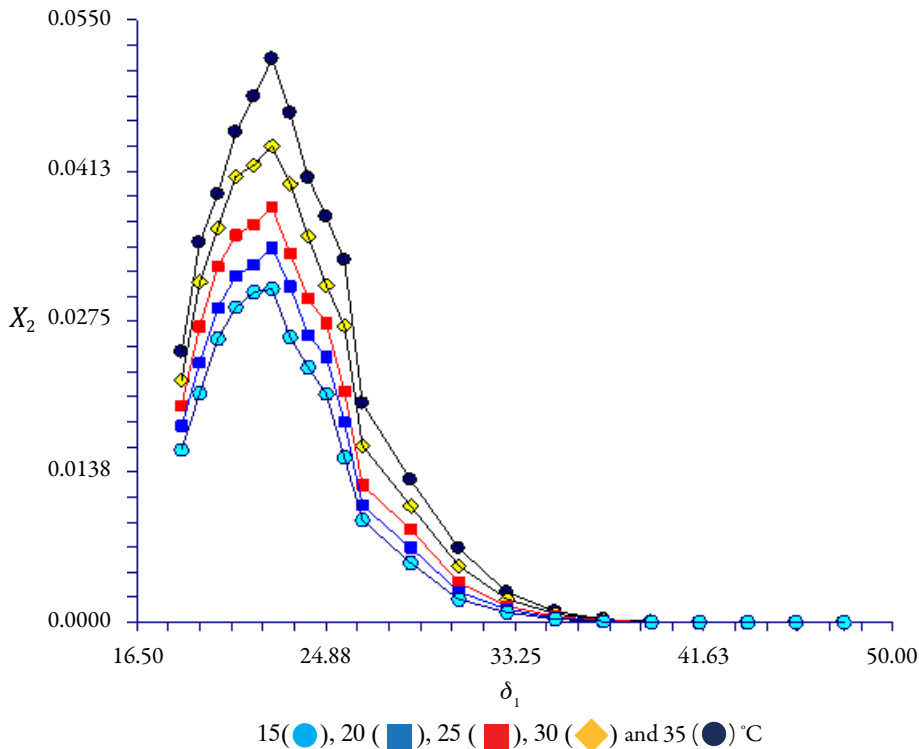


Figure 4. Solubility profile of CLX in ethanol-water ($\delta_1=26.51-47.97 \text{ MPa}^{1/2}$) and ethanol-ethyl acetate ($\delta_1=26.51-18.49 \text{ MPa}^{1/2}$) at several temperatures.

Hoff equation, where T_{bm} is the harmonic mean temperature = 297.98 K of the experimental temperatures used, 288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15 K, and R is the gas constant (8.3145 J/K.mol). From this regression, the intercept gives the apparent Gibbs free energy change, ΔG_{bm}^S , at the experimental harmonic mean temperature, T_{bm} [22].

$$\Delta H^S = -R \times \text{slope} \tag{1}$$

$$\Delta G_{bm}^S = R \times T_{bm} \times \text{intercept} \tag{2}$$

Using this approach, Krug *et al.* [22] demonstrated that the errors of the slope and the intercept are not correlated, and the calculated thermodynamic magnitudes can be used to detect a true chemical compensation relationship. The slopes of the van't Hoff relationships were negative (r^2 values range between 0.98 - 0.99), meaning that the heat of solution is endothermic. The straight lines were not parallel indicating that the apparent heat of mixing ($\Delta H^M = \Delta H^S - \Delta H^F$) changed with ethanol ratio because the heat of fusion (ΔH^F) of the solid phase at equilibrium with the saturated solutions

Table 4. Application of the Fedors' method to estimate internal energy, molar volume, and Hildebrand solubility parameter of CLX.

| Atom or functional group | N.º of atoms or functional groups | ΔE (cal/mol) | ΔV (cm ³ /mol) |
|--------------------------|-----------------------------------|--|---|
| CF ₃ | 1 | 1020 | 57.5 |
| CH ₃ | 1 | 1125 | 33.5 |
| -CH= | 9 | 1030 | 13.5 |
| -C= | 6 | 1030 | -5.5 |
| S | 1 | 3380 | 12 |
| O | 2 | 800 | 3.8 |
| -NH ₂ | 1 | 3000 | 19.2 |
| -N= | 2 | 2800 | 5.0 |
| Ring 5 atoms or more | 3 | 250 | 16 |
| Double conjugated bonds | 8 | 400 | -2.2 |
| | | $\Sigma\Delta E = 35\,125$ cal/mol | $\Sigma\Delta V = 258.7$ cm ³ /mol |
| | | $\delta_2^2 = 135.77$ cal/cm ³ | |
| | | $\delta_2 = 11.65$ (cal/cm ³) ^½ | |
| | | $\delta_2 = 23.83$ MPa ^½ | |

did not differ from the values obtained for the original powder. The standard entropic change for solution process, ΔS^S , obtained from the respective ΔH^S and ΔG_{bm}^S values by using equation 3:

$$\Delta S^S = (\Delta H^S - \Delta G_{bm}^S) / T_{bm} \quad (3)$$

Table 5 explains the apparent thermodynamic quantities of solution of CLX in all the ethanol-water and ethanol-ethyl acetate cosolvent mixtures, at 297.98 K as function of mixtures composition. The standard Gibbs free energy of solution, ΔG_{bm}^S , is positive (unfavourable) in all cases as also is the enthalpy of solution, ΔH^S ; therefore, it can be assured that the process is always endothermic. Figure 5 presents the standard molar thermodynamic functions for dissolution of CLX in all the cosolvent mixtures; it can observe ΔH^S increases from 0 to 40% ethanol ($\delta_1 = 39.40$ MPa^{1/2}). Since enthalpy is unfavourable, the initial solubility enhancement at the water-rich region (see figure 4) is entropy driven. The enthalpy increase cannot be due to larger cavity formation energy because this energy should be smaller in ethanol than in water. This is possi-

bly related to the breaking of the ice-like structure of water (hydrogen bonds) around the solute, which increases both the enthalpy of and the entropy of the system. This result shows that ethanol can lower the hydrophobic hydration effect despite being itself a hydrogen-bonded solvent. ΔH^s of CLX decreases above 40% ethanol in water (see figure 5).

Therefore, favourable enthalpy is the driving force that enhances solubility at the polar region included between $\delta_1 = 39.40$ and $\delta_1 = 26.51$ MPa^{1/2}. These results corroborate other findings about solubility enhancement, which is entropy driven at the water-rich region and enthalpy controlled at the ethanol-rich region [23-29]. The similar pattern observed for drugs of different nature at the water-rich region suggests that the loss of the solvent structure (entropy as the driven force) is responsible for the initial solubility enhancement in aqueous mixtures. The ratio at which the dominant mechanism changes to enthalpy depends on the nature and polarity of the drug. Figure 5 displays the enthalpy curves in the non-aqueous, less polar mixture. The enthalpy changes are much smaller (29 to 16 kJ/mol) than in the aqueous mixture. There are not slope changes, indicating that a single mechanism, enthalpy, controls the solubility enhancement.

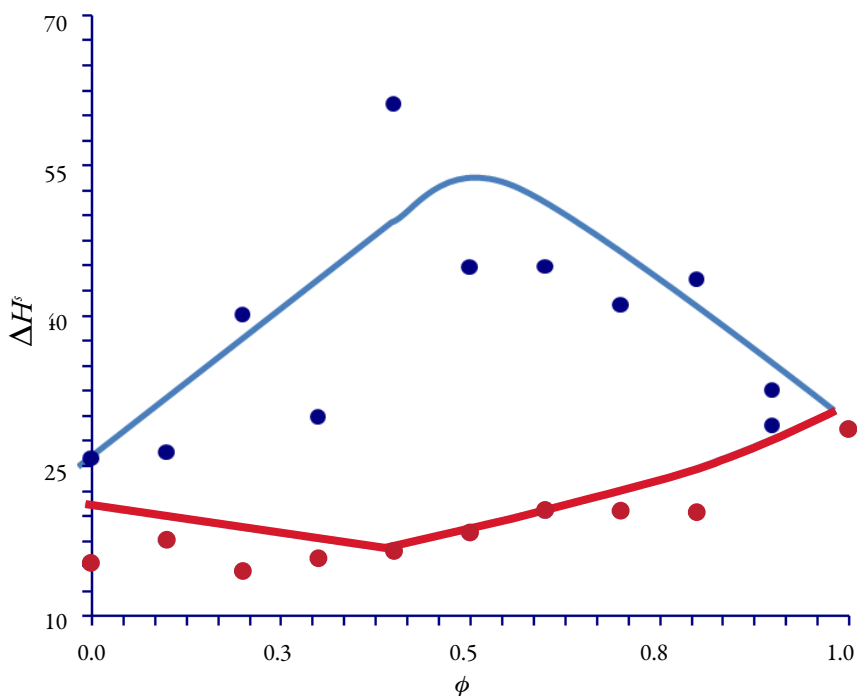


Figure 5. Apparent heats of solution of CLX in ethanol-water mixtures (blue) and in ethanol-ethyl acetate (red).

Table 5. Thermodynamic functions of solution for CLX in ethanol-water and ethanol-ethyl acetate cosolvent mixtures at 298.0 K.

| Cosolvent ^a | ΔG^S (kJ/mol) | ΔH^S (kJ/mol) | ΔS^S (J/mol.K) | $T\Delta S^S$ (kJ/mol) | % $\xi\Delta H$ | % $\xi T\Delta S$ |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------|
| Ethanol – water mixtures | | | | | | |
| 0.00 | 43.23 | 25.68 | -58.9 | -17.55 | 59.40 | 40.60 |
| 0.10 | 40.75 | 26.25 | -48.6 | -14.50 | 64.41 | 35.59 |
| 0.20 | 34.70 | 39.98 | 17.7 | 5.28 | 88.07 | 11.93 |
| 0.30 | 32.10 | 29.77 | -7.8 | -2.33 | 92.75 | 7.25 |
| 0.40 | 25.95 | 61.02 | 117.6 | 35.07 | 63.50 | 36.50 |
| 0.50 | 21.61 | 44.75 | 77.6 | 23.14 | 65.91 | 34.09 |
| 0.60 | 18.54 | 44.88 | 88.2 | 26.30 | 63.03 | 36.97 |
| 0.70 | 15.99 | 40.99 | 83.8 | 25.00 | 62.12 | 37.88 |
| 0.80 | 13.82 | 43.58 | 99.8 | 29.76 | 59.42 | 40.58 |
| 0.90 | 11.81 | 32.42 | 69.1 | 20.61 | 61.14 | 38.86 |
| 1.00 | 10.71 | 28.54 | 59.8 | 17.84 | 61.54 | 38.46 |
| Ethanol-ethyl acetate mixtures | | | | | | |
| 0.90 | 9.08 | 28.93 | 66.6 | 19.85 | 59.30 | 40.70 |
| 0.80 | 8.19 | 20.25 | 40.4 | 12.06 | 62.68 | 37.32 |
| 0.70 | 7.60 | 20.38 | 42.9 | 12.79 | 61.45 | 38.55 |
| 0.60 | 6.93 | 20.47 | 45.4 | 13.54 | 60.19 | 39.81 |
| 0.50 | 6.32 | 18.22 | 39.9 | 11.90 | 60.49 | 39.51 |
| 0.40 | 6.07 | 16.40 | 34.6 | 10.33 | 61.36 | 38.64 |
| 0.30 | 5.81 | 15.72 | 33.2 | 9.91 | 61.33 | 38.67 |
| 0.20 | 5.69 | 14.44 | 29.3 | 8.74 | 62.28 | 37.72 |
| 0.10 | 5.69 | 17.49 | 39.6 | 11.80 | 59.72 | 40.28 |
| 0.00 | 5.97 | 15.21 | 31 | 9.23 | 62.22 | 37.78 |

^a is the percentage of ethanol in the ethanol + water or ethanol–ethyl acetate mixtures free of CLX.

Figure 6 displays the Gibbs energy curve behaviour ΔG_{lm}^S values are positive demonstrating apparently non-spontaneity of the liquid solution process and in all cases, the experimental solubilities are lower than the ideal solubilities excepting at 100 % ethanol. In the polar mixture, the enthalpy of solution changed from 61 to 28 kJ/mol and the standard Gibbs energy of solution from 43 to 10 kJ/mol, values demonstrating substantial enthalpy-entropy compensation in a process that is largely enthalpy-driven (see figure 7).

This can be verified by calculating the relative contributions by enthalpy ($\xi\Delta H^S$) and entropy ($\xi T\Delta S^S$) toward the solution processes are given by equations (4) and (5) [30]. The main contributor to the (positive) standard molar Gibbs energy of solution, in most cases is the (positive) solution enthalpy.

$$\xi\Delta H = \frac{|\Delta H|}{|\Delta H| + |T\Delta S|} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\xi T\Delta S = \frac{|T\Delta S|}{|\Delta H| + |T\Delta S|} \cdot 100 \quad (5)$$

Thermodynamic functions of transfer

The thermodynamic functions of transfer from the more polar to the less polar mixtures are obtained to validate the effect of solvent composition on the solubility increase (see tables 6 and 7). These new functions of transfer ($\Delta G_{bm,AB}^S$, ΔH_{AB}^S and ΔS_{AB}^S) were calculated as the differences between the thermodynamic quantities of mixing obtained in the more polar mixtures and the less polar ones, where $\Delta H^M = \Delta H^S - \Delta H^F$ and $\Delta S^M = \Delta H^F / T^F$, at the same time ΔH^F and T^F , were obtained by DSC. For the aqueous mixture (see table 6) is favourable (negative values) when going from a more polar to a less polar medium (increasing ethanol concentrations). The addition of ethanol to water

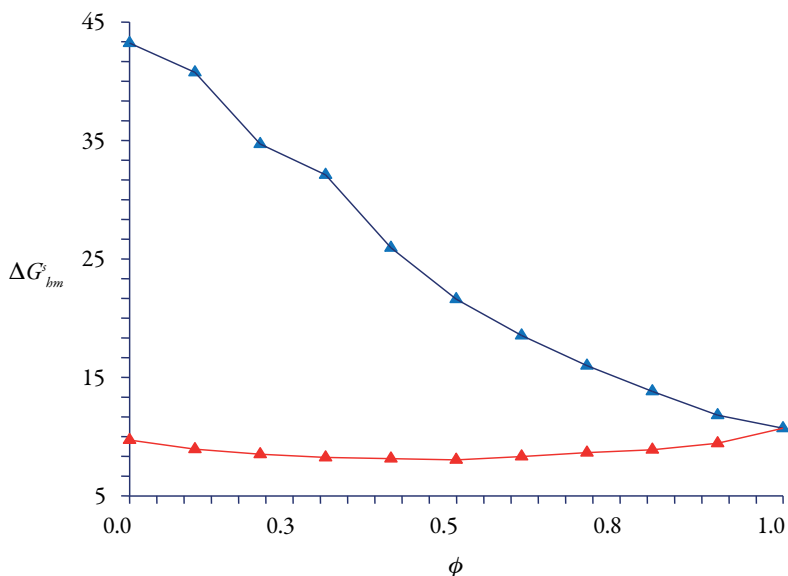


Figure 6. Apparent free energy of solution of CLX in ethanol-water mixtures (blue) and in ethanol-ethyl acetate (red).

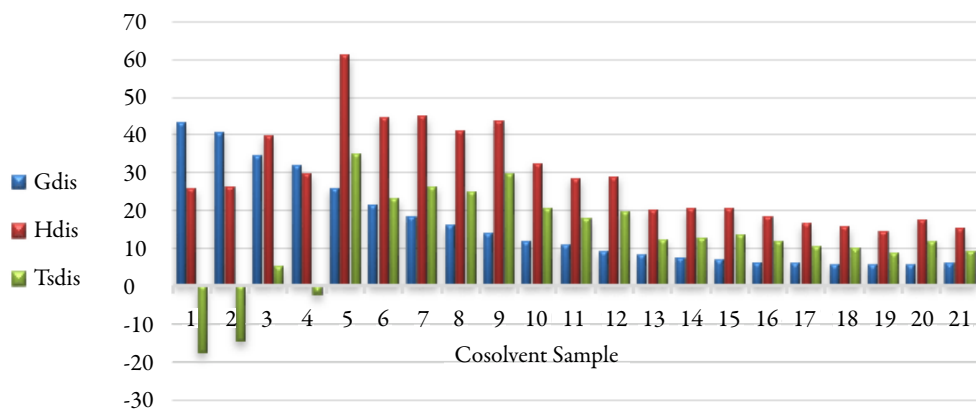


Figure 7. Thermodynamic functions of dissolution of celecoxib: ΔG^S (blue), ΔH^S (red), and $T\Delta S^S$ (green).

decreases the medium polarity (lower solubility parameter values). The solubility process is entropy driven from water to 0.40 volumetric fraction of ethanol. Both are less than zero as the medium polarity is further decreased (0.5-1 volumetric fraction of ethanol) and the solubility process is enthalpy driven.

The opposite trends are observed in the case of the non-aqueous mixture (see table 7). The transfer from the more polar (higher ethanol concentrations) to the less polar mixtures

Table 6. Thermodynamic functions of transfer for CLX from more polar solvents to less polar solvents in ethanol + water cosolvent mixtures at 298.0 K.

| Ethanol / volume fraction | | $\Delta G_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ | $\Delta H_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ | $\Delta S_{A \rightarrow B}^0$ J mol ⁻¹ K ⁻¹ | $T\Delta S_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ |
|------------------------------|----------|--|--|---|---|
| Medium A | Medium B | | | | |
| 0.00 | 0.10 | 2.48 | -0.57 | -10.22 | -3.05 |
| 0.10 | 0.20 | 6.05 | -13.73 | -66.35 | -19.78 |
| 0.20 | 0.30 | 2.61 | 10.21 | 25.51 | 7.61 |
| 0.30 | 0.40 | 6.15 | -31.25 | -125.44 | -37.40 |
| 0.40 | 0.50 | 4.34 | 16.27 | 40.00 | 11.93 |
| 0.50 | 0.60 | 3.07 | -0.09 | -10.59 | -3.16 |
| 0.60 | 0.70 | 2.55 | 3.85 | 4.37 | 1.30 |
| 0.70 | 0.80 | 2.17 | -2.59 | -15.97 | -4.76 |
| 0.80 | 0.90 | 2.01 | 11.16 | 30.68 | 9.15 |
| 0.90 | 1.00 | 1.10 | 3.88 | 9.31 | 2.78 |
| 1.00 | 0.00 | 1.63 | -0.50 | -6.77 | -2.02 |

Table 7. Thermodynamic functions of transfer for CLX from more polar solvents to less polar solvents in ethanol + ethyl acetate cosolvent mixtures at 298.0 K.

| Ethyl acetate Volume fraction | | $\Delta G_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ | $\Delta H_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ | $\Delta S_{A \rightarrow B}^0$ J mol ⁻¹ K ⁻¹ | $T\Delta S_{A \rightarrow B}^0$ kJ mol ⁻¹ |
|----------------------------------|----------|--|--|---|---|
| Medium A | Medium B | | | | |
| 0.00 | 0.10 | 1.63 | -0.39 | -6.77 | -2.02 |
| 0.10 | 0.20 | 0.89 | 8.68 | 26.14 | 7.79 |
| 0.20 | 0.30 | 0.60 | -0.13 | -2.44 | -0.73 |
| 0.30 | 0.40 | 0.66 | -0.08 | -2.51 | -0.75 |
| 0.40 | 0.50 | 0.61 | 2.24 | 5.48 | 1.63 |
| 0.50 | 0.60 | 0.25 | 1.82 | 5.29 | 1.58 |
| 0.60 | 0.70 | 0.26 | 0.68 | 1.39 | 0.41 |
| 0.70 | 0.80 | 0.12 | 1.29 | 3.93 | 1.17 |
| 0.80 | 0.90 | 0.00 | -3.05 | -10.24 | -3.05 |
| 0.90 | 1.00 | -0.28 | 2.28 | 8.60 | 2.56 |

(higher ethyl acetate concentrations) is enthalpy driven ($\Delta H_{A \rightarrow B}^0 < 0$ and $\Delta S_{A \rightarrow B}^0 < 0$) for 0.0, 0.3, 0.8 and 0.9 mass fraction of ethyl acetate. However, for 0.1, 0.2 and from 0.4 to 0.7 mass fraction of ethyl acetate, $\Delta H_{A \rightarrow B}^0 > 0$ and $\Delta S_{A \rightarrow B}^0 > 0$ and the solubility process is controlled by entropy.

Enthalpy-entropy compensation analysis of CLX

There are several reports in the literature that have demonstrated enthalpy-entropy compensation effects for the solubility of drugs in aqueous or non-aqueous co-solvent mixtures. The graph of ΔH^S as a function of ΔG_{bm}^S at mean harmonic temperature allows us to observe similar mechanisms for the dissolution process according to the tendencies obtained [24, 25, 27, 31-34]. Figure 8 shows fully that CLX in the cosolvent system presents nonlinear ΔH^S vs ΔG_{bm}^S compensation with positive slope in an interval from pure ethanol to 40 % ethanol in water. On the other hand, from pure water up to 40 % ethanol in water a negative slope is obtained. Accordingly, it follows that the driving function for the drug dissolution process is the enthalpy in the former case; while in the second case, the driving function is mainly the entropy. The results show the usefulness of the enthalpy-entropy compensation analysis to identify changes of the mechanism of co-solvent action.

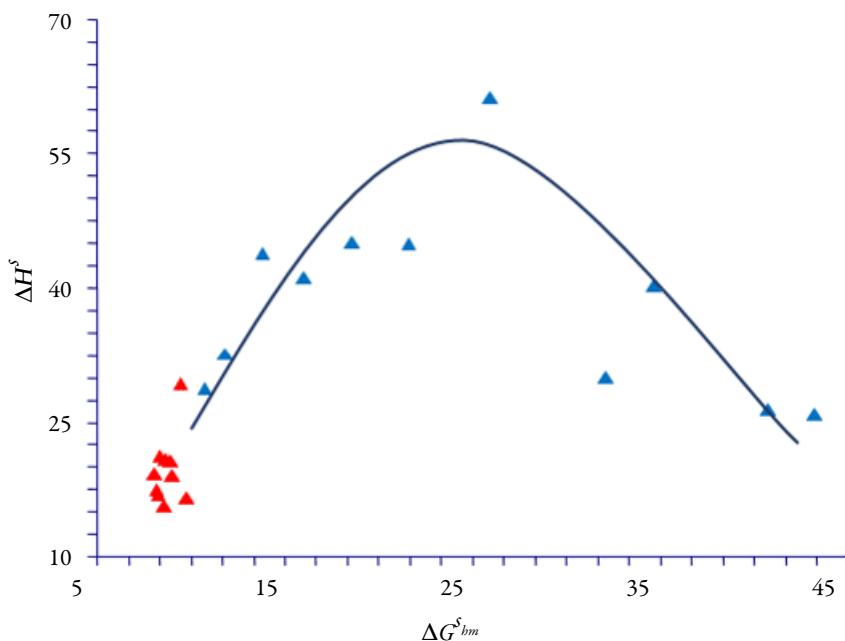


Figure 8. Enthalpy-entropy compensation in ethanol-water (blue) and ethanol-ethyl acetate mixtures (red).

CONCLUSION

The equilibrium solubility of CLX in ethanol-water and ethanol-ethyl acetate at $T = 288.15$ – 308.15 K was reported, mole fraction solubility of CLX increases continuously from neat water to 50% ethanol in ethyl acetate ($\delta_1 = 22.50 \text{ MPa}^{1/2}$) at all temperatures studied. Based on van't Hoff equations the respective apparent thermodynamic quantities of solution and transfer of CLX were calculated. In ethanol–water, the enthalpy of solution curve against solvent composition passes through a maximum at 40% ethanol in water. Non-linear enthalpy-entropy compensation analysis is observed demonstrating different dissolution mechanism with the variation in the proportion of the cosolvent.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. P. Patrignani, C. Patrono, Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1851**, 422-432 (2015).
2. H. Xu, F. Shen, Q.Z. Lv, Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in chemo-resistant gastric cancer xenograft mouse models through a cyclooxygenase-2-dependent manner, *Eur. J. Pharmacol.*, **776**, 1-8 (2016).
3. S. Tacconelli, A. Bruno, R. Grande *et al.*, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular safety - translating pharmacological data into clinical read-outs, *Expert Opin. Drug Saf.*, **16**, 791-807 (2017).
4. P. Bustamante, B. Escalera, A. Martin *et al.*, Predicting the Solubility of Sulfamethoxypyridazine in Individual Solvents I: Calculating Partial Solubility Parameters, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 567-573 (1989).
5. M.A. Peña, P. Bustamante, A. Reíllo, *Nuevos métodos basados en el parámetro de solubilidad de Hildebrand y los parámetros de solubilidad parciales aplicables a formulación de medicamentos*, Tesis doctoral, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España, 2001.
6. P.J. Sinko, Y. Singh, *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*, 6th edition, Lippincot Willian and Wilkins, New York, 2013.
7. R. Martínez, *Tratado de tecnología farmacéutica, Vol. I Sistemas farmacéuticos*, Síntesis, Madrid, 2016.
8. G. Chawla, P. Gupta, R. Thilagavathi *et al.*, Characterization of solid-state forms of celecoxib, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **20**, 305-317 (2003).
9. G. Chawla, A.K. Bansal, Effect of processing on celecoxib and its solvates, *Pharm. Dev. Technol.*, **9**, 419-433 (2004).
10. J.E. Frampton, G.M. Keating, Celecoxib: a review of its use in the management of arthritis and acute pain, *Drugs*, **67**, 2433-2472 (2007).
11. X. Wang, Q. Zhang, L. Jiang *et al.*, Isostructurality in six celecoxib co-crystals introduced by a solvent inclusion, *Crystengcomm*, **16**, 10959-10968 (2014).
12. Mettler-Toledo, Calorimetría diferencial de barrido (DSC) (2012), URL: https://www.mt.com/es/es/home/library/on-demand-webinars/lab-analytical-instruments/DSC_TA.html, accessed June 17, 2017.

13. L.J. Ferro, P.J. Miyake, Polymorphic crystalline forms of celecoxib US Patent 7, 476-744 (2009).
14. P. Gupta, V.K. Kakumanu, A.K. Bansal, Stability and solubility of celecoxib-PVP amorphous dispersions: a molecular perspective, *Pharm. Res.*, **21**, 1762-1769 (2004).
15. P. Gupta, R. Thilagavathi, A.K. Chakraborti *et al.*, Role of molecular interaction in stability of celecoxib-PVP amorphous systems, *Mol. Pharm.*, **2**, 384-391 (2005).
16. G.W. Lu, M. Hawley, M. Smith *et al.*, Characterization of a novel polymorphic form of celecoxib, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 305-317 (2006).
17. K. Grzybowska, M. Paluch, A. Grzybowski *et al.*, Molecular dynamics and physical stability of amorphous anti-inflammatory drug: Celecoxib, *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 12792-12801 (2010).
18. P. Bustamante, S. Muela, B. Escalera *et al.*, Solubility behavior and prediction for antihelmintics at several temperatures in aqueous and nonaqueous mixtures, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 644-649 (2010).
19. M. Abbas, J. Vaez-Gharamaleki, R. Fazeli-Bakhtiyari *et al.*, Prediction of deferiprone solubility in some non-aqueous binary solvent mixtures at various temperatures, *J. Mol. Liq.*, **203**, 16-19 (2015).
20. M.A. Peña, A. Reillo, B. Escalera *et al.*, Solubility parameter of drugs for predicting the solubility profile type within a wide polarity range in solvent mixtures, *Int. J. Pharm.*, **321** 155-161 (2006).
21. R.A. Fedors, A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.*, **14**, 147-154 (1974).
22. R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Grieger, Enthalpy-entropy compensation. 1. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2335-2341 (1976).
23. C. Bustamante, P. Bustamante, Nonlinear enthalpy-entropy compensation for the solubility of phenacetin in dioxane-water solvent mixtures, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1109-1111 (1996).
24. P. Bustamante, S. Romero, M.A. Peña *et al.*, Nonlinear enthalpy-entropy compensation for the solubility of drugs in solvent mixtures: paracetamol, acetanilide and nalidixic acid in dioxane-water, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1590-1596 (1998).

25. P. Bustamante, J. Navarro, S. Romero *et al.*, Thermodynamic origin of the solubility profile of drugs showing one or two maxima against the polarity of aqueous and nonaqueous mixtures: niflumic acid and caffeine, *J. Pharm. Sci.* **91**, 874-883 (2002).
26. M.A. Peña, B. Escalera, A. Reíllo *et al.*, Thermodynamics of cosolvent action: phenacetin, salicylic acid and probenecid, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1129-1135 (2009).
27. F. Martínez, P. Bustamante, M.A. Peña, Thermodynamic analysis and enthalpy-entropy compensation for the solubility of indomethacin in aqueous and non-aqueous mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **308**, 98-107 (2011).
28. F. Martínez, A. Jouyban, W.E. Acree, Jr., Further numerical analysis on the solubility of ibrutinib in ethanol + water mixtures at different temperatures, *J. Mol. Liq.*, **218**, 35-38 (2016).
29. K. Moodley, J. Rarey, D. Ramjugernath, Experimental solubility for betulin and estrone in various solvents within the temperature range $T = (293.2 \text{ to } 328.2) \text{ K}$, *J. Chem. Thermodyn.*, **98**, 42-50 (2016).
30. G.L. Perlovich, N.N. Strakhova, V.P. Kazachenko *et al.*, Sulfonamides as a subject to study molecular interactions in crystals and solutions: sublimation, solubility, solvation, distribution and crystal structure, *Int. J. Pharm.*, **349** 300-312 (2008).
31. M. Meloun, Z. Ferencíková, Enthalpy-entropy compensation for some drugs dissociation in aqueous solutions, *Fluid Phase Equilib.*, **328**, 31-41 (2012).
32. D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamerazine in methanol+ water mixtures, *J. Solution Chem.*, **44**, 360-377 (2015).
33. D.M. Jiménez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado *et al.*, Solubility temperature dependence and preferential solvation of sulfadiazine in 1,4-dioxane + water co-solvent mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **397**, 26-36 (2015).
34. J. Pérez-Benito, M. Mulero-Raichs, Enthalpy-entropy compensation effect in chemical kinetics and experimental errors: a numerical simulation approach, *J. Phys. Chem. A.*, **120**, 7598-7609 (2016).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

M.Á. Peña, B. Escalera, N. Torres, Thermodynamic analysis of celecoxib in amphiprotic and amphiprotic-aprotic solvent mixtures at several temperatures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 528-546 (2019).

Descripción teórica de la posibilidad de la detección electroquímica de la gabapentina, asistida por CoO(OH)

Volodymyr Tkach^{1,2*}, Marta V. Kushnir¹, Sílvio C. de Oliveira², Olga Luganska³, Hélder Briosa e Gala⁴, Karina V. Palamarek⁵, Inna P. Danyliuk⁵, Petro I. Yagodynets^{1,5}

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

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.

⁴Action4Touch, ActionB4Touch, Rua das Sudas, Bl. 1, R/C. Esq., 3770-067, Oiã, Aveiro, Portugal.

⁵Instituto de Chernivtsi de la Universidad Nacional de Comercio y Economía de Kiev, 58000, Plaza Central, 9, Chernivtsi, Ucrania.

*Correo electrónico: nightwatcher2401@gmail.com

Recibido para evaluación: 27 de diciembre de 2018

Aceptado para publicación: 11 de julio de 2019

RESUMEN

La posibilidad de usar el oxihidróxido del cobalto en la detección electroquímica de la gabapentina ha sido evaluada, y se sugirió un mecanismo del desempeño del analito y del modificador. Este fue desarrollado y analizado (mediante la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones) un modelo matemático basado en este mecanismo. La evaluación teórica confirma que el oxihidróxido de cobalto puede ser un modificador eficiente para la detección de la gabapentina, a pesar de la hibridez de su mecanismo de oxidación. La posibilidad y las causas de los comportamientos oscilatorio y monótono también han sido investigadas.

Palabras clave: electrodos químicamente modificados, gabapentina, oxihidróxido de cobalto, sensor electroquímico, estado estacionario estable.

SUMMARY

The theoretical description for CoO(OH)-assisted gabapentine electrochemical determination

The possibility for the use of cobalt (III) oxyhydroxide in gabapentine electrochemical determination has been evaluated. A mechanism for analyte and modifier function has been suggested. A mathematical model based in this mechanism has been developed and analyzed (by means of linear stability theory and bifurcation analysis). The theoretical evaluation confirms that the cobalt (III) oxyhydroxide may be an efficient modifier for gabapentine electrochemical determination, despite of the hybridity of its oxidation mechanism. The possibility and the causes for oscillatory and monotonic instabilities have also been investigated.

Key words: chemically modified electrodes, gabapentine, cobalt (III) oxyhydroxide, electrochemical sensor, stable steady-state.

INTRODUCCIÓN

La gabapentina [1], es decir, el ácido 1-(aminometil) ciclohexanoacético (ver figura 1) es un anticonvulsante (CAS: 60142-96-3, M=171,23 g/mol), programado como análogo del ácido gama-aminobutírico (AGAB). La gabapentina es capaz de atravesar la barrera hemoencefálica manteniendo las propiedades del AGAB, por contener un fragmento lipofílico (en este caso, el anillo ciclohexánico) [1, 2].

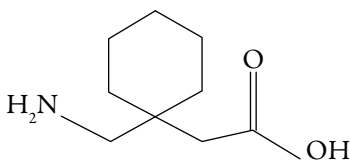


Figura 1. La gabapentina.

Sin embargo, su uso excesivo puede causar algunos efectos colaterales [3, 4], cuyo efecto es fuertemente dependiente de concentración. Por eso, el desarrollo de una metodología capaz de detectar rápida, exacta y sensiblemente su concentración es, sin duda, una tarea actual [5-20].

La gabapentina contiene pocos enlaces insaturados, grupos cromofóricos o fragmentos fáciles de oxidar. No por ello se termina la búsqueda de nuevas técnicas no electroquí-

micas y electroquímicas, aunque se pueda requerir la modificación del propio analito o del electrodo (en el caso de métodos electroanalíticos) por materiales como polímeros conductores, derivados ferrocénicos, materiales de carbono, nanopartículas conductoras y semiconductoras, que contienen metales.

Uno de los modificadores interesantes para la cuantificación de la gabapentina podría ser el oxihidróxido del cobalto [21-24], el semiconductor de tipo *p* cuya eficiencia electroanalítica para compuestos semejantes ya ha sido confirmada experimental [21, 22] y teóricamente [23, 24].

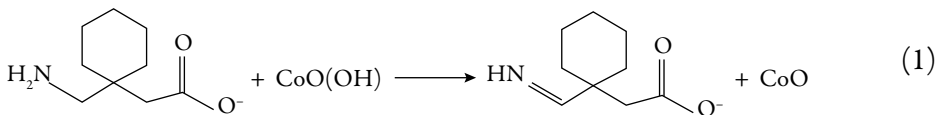
Sin embargo, el desarrollo y uso de los métodos electroanalíticos, principalmente los nuevos, requiere el entendimiento del mecanismo del desempeño del analito y del modificador en el sistema. Otro problema que surge es la aparición de estabilidades electroquímicas, pues tanto la electrosíntesis del CoO(OH) [25, 26], como la electrooxidación de la gabapentina [20, 27] son acompañadas por las oscilaciones en corriente. Por eso, el análisis teórico *a priori* es necesario para avalar el comportamiento del sistema electroanalítico antes de ponerlo en práctica.

Así, el objetivo general de este trabajo es este análisis aplicado al sistema con la detección electroquímica de la gabapentina en el ánodo, modificado por CoO(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 el de los semejantes [23, 24, 27, 28].

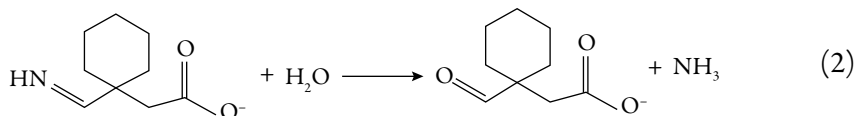
EL SISTEMA Y SU MODELO

El mecanismo de la electrooxidación de la gabapentina es conocido por su hibridez. Por eso, su comportamiento en la presencia del oxihidróxido de cobalto es de particular interés.

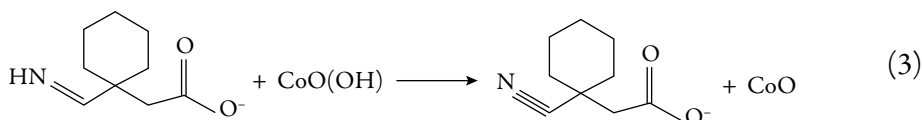
En la primera etapa, la gabapentina se oxida, perdiendo dos protones y dos electrones, formando la imina; ya el oxihidróxido de cobalto es reducido hasta CoO:



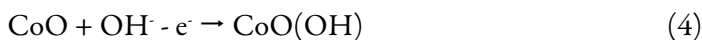
Después, la imina se hidroliza mediante la reacción (2):



o se oxida hasta el nitrilo correspondiente:



la reversibilidad del electrodo se realiza por la reacción (4):



Considerando lo citado anteriormente, para describir el comportamiento de este sistema, nosotros introducimos tres variables:

g : la concentración de gabapentina en la capa presuperficial

G : la concentración del producto primario de su oxidación

θ : el grado de recubrimiento de la superficie por el óxido de cobalto.

Para simplificar el modelo, suponiendo que el reactor se agite intensamente, lo que nos deja menospreciar el flujo de convección. De otro lado, suponemos que el electrolito de soporte esté presente en su exceso, permitiendo ignorar 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 .

Se puede mostrar fácilmente que el comportamiento del sistema puede ser descrito por el conjunto de tres ecuaciones diferenciales de balance a seguir:

$$\begin{cases} \frac{dg}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (g_0 - g) - r_1 \right) \\ \frac{dG}{dt} = \frac{2}{\delta} (r_1 - r_2 - r_3) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{X} (r_1 + r_3 - r_4) \end{cases} \quad (5)$$

siendo Δ el coeficiente de difusión de la gabapentina, g_0 su concentración en la capa presuperficial, X es la concentración superficial máxima del óxido de cobalto en la

superficie del cátodo y los parámetros r son las velocidades de las velocidades correspondientes, que se pueden calcular como:

$$r_1 = k_1 g (1 - \theta)^2 \quad (6)$$

$$r_2 = k_2 G \quad (7)$$

$$r_3 = k_3 G (1 - \theta)^2 \quad (8)$$

$$r_4 = k_4 \theta \exp \frac{F\varphi_0}{RT} \quad (9)$$

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, R es la constante universal de gases y T es la temperatura absoluta.

Como se ve, la hibridez del mecanismo de oxidación no compromete la reproducibilidad del modificador del ánodo, lo que se demostrará más adelante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar el proceso electroanalítico de la detección de la gabapentina asistida por el oxihidróxido de cobalto trivalente, analizamos el conjunto de ecuaciones (5) junto con las relaciones algebraicas (6-9), mediante la teoría de estabilidad lineal. Los elementos estacionarios de la matriz funcional de Jacobi pueden ser descritos como:

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

en que:

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

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

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} (2k_1 g (1 - \theta)) \quad (13)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} (k_1 (1 - \theta)^2) \quad (14)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} \left(-k_2 - k_3(1-\theta)^2 \right) \quad (15)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} \left(-2k_1g(1-\theta) + 2k_3G(1-\theta) \right) \quad (16)$$

$$a_{31} = \frac{1}{X} \left(k_1(1-\theta)^2 \right) \quad (17)$$

$$a_{32} = \frac{1}{X} \left(k_3(1-\theta)^2 \right) \quad (18)$$

$$a_{33} = \frac{1}{X} \left(-2k_1g(1-\theta) - 2k_3G(1-\theta) - k_4 \exp \frac{F\varphi_0}{RT} - jk_4\theta \exp \frac{F\varphi_0}{RT} \right) \quad (19)$$

Teniendo en cuenta las expresiones (11), (15) y (19) se puede ver que el comportamiento oscilatorio en este caso puede ser posible porque es causado apenas por las influencias de la etapa electroquímica, descritas por el elemento $jk_4\theta \exp \frac{F\varphi_0}{RT}$, que puede ser positivo, si $j < 0$, y corresponde a esas influencias, típicas, también, para sistemas semejantes [23, 24, 27, 28]. Apesar de la hibridez del mecanismo y de la interacción de oxihidróxido de cobalto con la gabapentina, las dos etapas de la electrooxidación asistida transforman el modificador en apenas una sustancia el óxido de cobalto (II), y la reversibilidad del electrodo se adquiere mediante apenas una reacción electroquímica la (4). Por eso existe solamente un factor capaz de causar el comportamiento oscilatorio.

Para investigar la estabilidad de estado estacionario, aplicamos al conjunto de ecuaciones diferenciales (5) y el criterio Routh-Hurwitz. Evitando las expresiones grandes, introducimos nuevas variables, para que el determinante del Jacobiano se describa como:

$$\frac{4}{\delta^2 X} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & 0 & \Sigma \\ \Xi & -k_2 - \Phi & P - \Sigma \\ \Xi & \Phi & -P - L \end{vmatrix} \quad (20)$$

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

$$(-\kappa_1 - \Xi)(k_2P + k_2P + \Phi L + \Phi \Sigma) < -\Sigma(2\Xi\Phi + \Xi k_2) \quad (21)$$

Este requisito se satisface de forma total, no habiendo influencias fuertes en la DCE (lo que se describe por la positividad del parámetro X). Con esto, la expresión del lado

izquierdo siempre tendrá valores más negativos que la del lado derecho, y el estado estacionario permanecerá estable. Desde que se satisfagan las condiciones de estabilidad del estado estacionario (porque, en este sistema, ningún factor puede comprometer la estabilidad del modificador y del analito con las reacciones laterales), será lineal la dependencia entre el parámetro electroanalítico y la concentración del analito, y la señal electroanalítica se hará fácil de interpretar. El proceso electroanalítico es controlado por la cinética de los procesos.

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

$$(-\kappa_1 - \Xi)(k_2P + k_2P + \Phi X + \Phi\Sigma) < -\Sigma(2\Xi\Phi + \Xi k_2) \quad (22)$$

En términos electroanalíticos, esta inestabilidad corresponde 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.

La detección electroanalítica de gabapentina también puede ser realizada en medio ácido, se basa en la reducción catódica de su grupo carboxílico sobre una amplia variedad de modificadores, como polímeros conductores (especialmente los que poseen grupos ácidos, capaces de inmovilizar el grupo amino), oxihidróxido de vanadio y sus compuestos con materiales orgánicos, otros compuestos de vanadio, electroquímicamente flexibles y estables en medios ácidos, nitruro de carbono. La detección electroanalítica por este escenario, bien como la síntesis del material modificador, se abordarán en uno de nuestros próximos trabajos.

CONCLUSIONES

A partir del análisis teórico de la posibilidad de la detección electroquímica de la gabapentina, asistida por el oxihidróxido de cobalto trivalente, se concluye que:

- CoO(OH) puede ser un modificador eficiente de ánodo para la detección de la gabapentina, pese que el mecanismo sea híbrido. El estado estacionario estable es electroanalíticamente eficiente y se mantiene fácilmente.
- El proceso electroanalítico es cinéticamente controlado.
- La inestabilidad oscilatoria, en este sistema, puede realizarse, esta es causada apenas por los factores de las influencias de la reacción electroquímica a la doble capa eléctrica.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. C.P. Taylor, N.S. Gee, T.Z. Su *et al.*, A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology, *Epilepsy Res.*, **29**, 233-249 (1998).
2. N.B. Finnerup, H. Gottrup, T.S. Jensen, Anticonvulsants in central pain, *Expert Opin. Pharm.*, **3**, 1411-1420 (2002).
3. <http://www.drugs.com/sfx/gabapentin-side-effects.html>
4. <http://www.rxlist.com/neurontin-side-effects-drug-center.htm>
5. K.C. Carlsson, J.L.E. Reubsæet, Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**, 415-423 (2004).
6. D.F. Chollet, L. Goumaz, C. Juliano, G. Anderegg, Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum, *J. Chromatogr. B*, **746**, 311-314 (2000).
7. O. Sagirli, S.M. Çetin, A. Önal, Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**, 618-624 (2006).
8. S.Y. Chang, F.Y. Wang, Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique, *J. Chromatogr. B*, **799**, 265-270 (2004).
9. B. Martinc, R. Roškar, I. Grabnar, T. Vovk, Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, **962**, 82-88 (2014).
10. S.Y. Chang, F.Y. Wang, Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique, *J. Chromatogr. B*, **799**, 265-270 (2004).

11. P. Rada, S. Tucci, J. Perez, L. Teneud, S. Chuecos, L. Hernandez, *In vivo* monitoring of gabapentin in rats: a microdialysis study coupled to capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **19**, 2976-2980 (1998).
12. C. Gambelunghe, G. Mariucci, M. Tantucci, M.V. Ambrosini, Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of gabapentin in serum, *Biomed. Chromatogr.*, **19**, 63-67 (2005).
13. L.L. Garcia, Z.K. Shihabi, K. Oles, Determination of gabapentin in serum by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **669**, 157-162 (1995).
14. M.M. Kushnir, J. Crossett, P.I. Brown, F.M. Urry, Analysis of gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 1-10 (1999).
15. R.N. Hegde, B.E.K. Swamy, N.P. Shetti, S.T. Nandibewoor, Electro-oxidation and determination of gabapentin at gold electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **635**, 51-58 (2009).
16. F. Jalali, E. Arkan, G. Bahram, Preparation of a gabapentin potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis, *Sens. Actuators B*, **127**, 304-309 (2007).
17. A. Yari, F. Papi, S. Farhadi, Voltammetric Determination of trace antiepileptic gabapentin with a silver-nanoparticle modified multiwalled carbon nanotube paste electrode, *Electroanalysis*, **23**, 2949-2954 (2011).
18. H. Heli, F. Faramarzi, N. Sattarahmady, Oxidation and determination of Gabapentin on nanotubes of nickel oxide-modified carbon paste electrode, *J. Solid State Electrochem.*, **16**, 45-52 (2012).
19. B.J. Sanghavi, O.S. Wolfbeis, T. Hirsch, N.S. Swami, Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs and neurotransmitters, *Microchim. Acta*, **182**, 1-41 (2015).
20. G. Karim-Nezhad, S. Pashazadeh, Electro-oxidation and determination of gabapentin at copper sulfide nanostructures modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **7**, 439-453 (2015).
21. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaissi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 122-126 (2015).

22. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E. Guimarães Castro *et al.*, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 318-322 (2015).
23. V. Tkach, Ya. Ivanushko, S.C. de Oliveira *et al.*, The theoretical evaluation of the possibility of CoO(OH)-assisted omeprazole electrochemical detection, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **8**, 749-760 (2016).
24. V. Tkach, Ya. Ivanushko, S. Lukanova *et al.*, The theoretical evaluation for the possibility of the CoO(OH)-assisted electrochemical detection in water, *Appl. J. Envir. Eng. Sci.*, **3**, 90-95 (2017).
25. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract N.º 2240, URL: <http://ma.ecsdl.org/content/MA2010-02/38/2240.full.pdf> Accessed August 8, 2015.
26. O. Stadnik, *Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt*, Diss. Kand. Chim. N. Kyiv, 2011.
27. V. Tkach, S.C. de Oliveira, G. Maia *et al.*, The mathematical investigation for the mechanism of the electrochemical oxidation of phenolic compounds over CoO(OH) in alkaline solution, *Mor. J. Chem.*, **4**, 153-160 (2016).
28. V. Tkach, Y. Ivanushko, S. Lukanova *et al.*, The theoretical description for mefloquine electrochemical detection, assisted by CoO(OH) conducting polymer composite, *Appl. J. Environ. Eng. Sci.*, **3**, 333-340 (2017).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, O. Luganska, H. Brios e Gala, K.V. Palamarek, I.P. Danyliuk, P.I. Yagodynets', Descripción teórica de la posibilidad de la detección electroquímica de la gabapentina, asistida por CoO(OH), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 547-556 (2019).

Síntesis, caracterización y evaluación farmacológica de nuevos complejos metálicos derivados de híbridos heteroaromáticos (benzimidazol/oxadiazol)

Ingri Y. Váquiro-Reyes¹, Alberto Aragón-Muriel¹, Dorian Polo-Cerón^{1*}

¹Laboratorio de Investigación en Catálisis y Procesos (LICAP), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 N.º 100-00, Santiago de Cali (76001), Colombia.

*Correo electrónico: dorian.polo@correounivalle.edu.co

Recibido para evaluación: 12 de febrero de 2019

Aceptado para publicación: 14 de agosto de 2019

RESUMEN

Este documento reporta la síntesis y caracterización detallada de complejos lantánidos La(III), Ce(III), Nd(III) y Sm(III), con ligandos tridentados derivados de híbridos heteroaromáticos. Los ligandos y sus respectivos complejos metálicos fueron caracterizados mediante diferentes técnicas fisicoquímicas, incluyendo análisis elemental y termogravimétrico; espectroscopias UV-Vis, IR, ¹H-NMR y ¹³C-NMR; mediciones de conductancia molar y espectrometría de masas. Los datos espectrales mostraron que el ligando híbrido se comporta como un ligando tridentado NOO a través de los átomos de nitrógeno y oxígeno de los anillos benzimidazol y oxadiazol, así como del átomo de oxígeno del grupo carbonilo. El análisis elemental y térmico mostró que los complejos metálicos obtenidos tienen una estequiometría 1:2 (metal:ligando). Se evaluó la capacidad antioxidante de los compuestos mediante los ensayos DPPH y medidas electroquímicas (voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada). Los resultados mostraron que los complejos metálicos tienen mayor actividad antioxidante que los ligandos libres. Finalmente, la actividad antibacteriana de los ligandos y sus complejos se determinaron mediante pruebas *in vitro* contra cepas bacterianas Gram positivas y cepas bacterianas Gram negativas utilizando el método de microdilución en caldo. Los complejos metálicos mostraron mayores actividades antimicrobianas que los ligandos precursores contra algunos de los microorganismos.

Palabras clave: actividad biológica, complejos lantánidos, actividad antioxidante, actividad antibacteriana.

SUMMARY

Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of new metal complexes derived from heteroaromatic hybrids (benzimidazole/oxadiazole)

This paper reports the synthesis and detailed characterization of lanthanide complexes La(III), Ce(III), Nd(III) y Sm(III) with tridentate ligands derived from heteroaromatic hybrids. The ligands and their metal complexes were characterized by different physicochemical techniques, including elemental and thermogravimetric analysis; UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy; molar conductance measurements; and mass spectrometry. The spectral data showed that the hybrid ligand behaves as a NOO tridentate ligand through the nitrogen and oxygen atoms of the benzimidazole and oxadiazole rings and the oxygen atom of the carbonyl group. Elemental and thermal analyses indicated that the obtained metal complexes were formed in 1:2 stoichiometry (metal-ligand). The antioxidant capacity of these compounds was evaluated by both DPPH· assay and electrochemical measurements (cyclic voltammetry and square wave voltammetry). The results showed that the metal complexes have higher antioxidant activity compare to the free ligands. Finally, the antibacterial activities of the ligands and their complexes were determined by *in vitro* tests against Gram-positive bacterial strains and Gram-negative bacterial strains using the broth microdilution method. The metal complexes showed greater antimicrobial activities than the precursor ligands against some of the microorganisms.

Key words: biological activity, lanthanide complexes, antioxidant activity, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales áreas de interés en la química medicinal moderna se centra en la búsqueda y desarrollo de compuestos con selectividad sintética, asequibles económicamente y con potentes propiedades farmacológicas, que les permitan competir de forma eficaz contra agentes microbianos multirresistentes causantes de múltiples enfermedades infecciosas [1]. Una estrategia emergente dentro de la química medicinal para el desarrollo de nuevos fármacos es la combinación de dos diferentes farmacóforos en una sola molécula, estrategia conocida como hibridación molecular [1, 2]. Estas moléculas son una poderosa herramienta en química medicinal ya que le permiten tener al nuevo fármaco diferentes funciones biológicas y una actividad dual [3], proporcionando terapias combinadas en un solo agente multifuncional haciéndolo más eficiente en tratamientos convencionales [4]. Esta área de investigación se encuentra en expansión

a nivel global y ha aportado de manera significativa al diseño y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En este sentido, los compuestos heterocíclicos juegan un rol importante en diversos procesos biológicos ya que hacen parte estructural de las células vivas, ADN y ARN, otorgándoles un amplio espectro de actividades farmacológicas con variadas aplicaciones terapéuticas. Dentro de las moléculas líderes para el diseño de potenciales agentes bioactivos se encuentran los compuestos con núcleos heteroaromáticos de benzimidazol u oxadiazol, los cuales son conocidos por tener actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, analgésica y antiinflamatoria [5, 6]. Esta actividad está relacionada con la capacidad de ser sustitutos bioisotéricos de grupos funcionales éster y amida, facilitando su interacción con enzimas y receptores en los sistemas biológicos [7].

Los compuestos heterocíclicos benzimidazol y oxadiazol son de gran importancia en el campo de la química inorgánica medicinal ya que pueden coordinarse a centros metálicos a través de los heteroátomos que poseen en su estructura, formando complejos cinéticamente inertes y termodinámicamente estables, aumentando la biodisponibilidad y selectividad de los mismos. Investigaciones recientes, han demostrado que la actividad biológica aumenta cuando ligandos con andamios orgánicos heterocíclicos se coordinan con centros metálicos, encontrando un efecto potenciador de sus propiedades farmacológicas, lo cual es de gran interés para la química medicinal [8].

Continuando con nuestros esfuerzos para desarrollar nuevos compuestos con actividad biológica [9], en este trabajo reportamos la síntesis de nuevos complejos metálicos derivados de híbridos heteroaromáticos. A continuación, se presenta una detallada caracterización de todos los compuestos, además de discutir los posibles mecanismos de acción antioxidante y antimicrobiana.

METODOLOGÍA

Los reactivos y solventes empleados para la síntesis de los compuestos obtenidos fueron adquiridos de las casas comerciales Sigma–Aldrich, Merck y Alfa Aesar® en grado analítico. Se utilizó sílica gel 60 F₂₅₄ con espesor de 0,25 mm para monitorear las reacciones. Los espectros de RMN-¹H, ¹³C y bidimensionales (HSQC, HMBC y COSY) fueron obtenidos con un espectrómetro de 400 MHz Bruker Ultra Shield, utilizando como solvente deuterado el DMSO-*d*₆.

Los espectros de infrarrojo fueron tomados en el espectrofotómetro SHIMADZU IR Affinity¹ (pastilla de KBr) y Thermo scientific Nicolet TM 6700 (ATR). El estudio de

la composición porcentual de los productos se realizó utilizando el analizador elemental Thermo Flash EA 1112 Series y el porcentaje de metal se determinó mediante titulación complexométrica con EDTA. Los espectros de masas se realizaron en el espectrómetro de masas SHIMADZU-GCMS-QP2010 usando ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un fusiómetro Stuart[®] SMP10. El análisis térmico se realizó en el equipo TGA 550 TA Instruments bajo atmósfera de nitrógeno. La conductividad de todos los complejos lantánidos se realizó en el equipo Orion[™] 131S. El estudio electroquímico fue registrado por voltamogramas en un bipotenciostato modelo 700B de CH Instruments.

Síntesis de los compuestos químicos

Las figuras 1 y 2 presentan la ruta sintética empleada para la obtención del ligando híbrido heteroaromático y sus complejos metálicos, respectivamente. Para la obtención del ligando orgánico 5 se utilizó una ruta sintética de 3 etapas, donde los compuestos intermedios fueron aislados y completamente caracterizados.

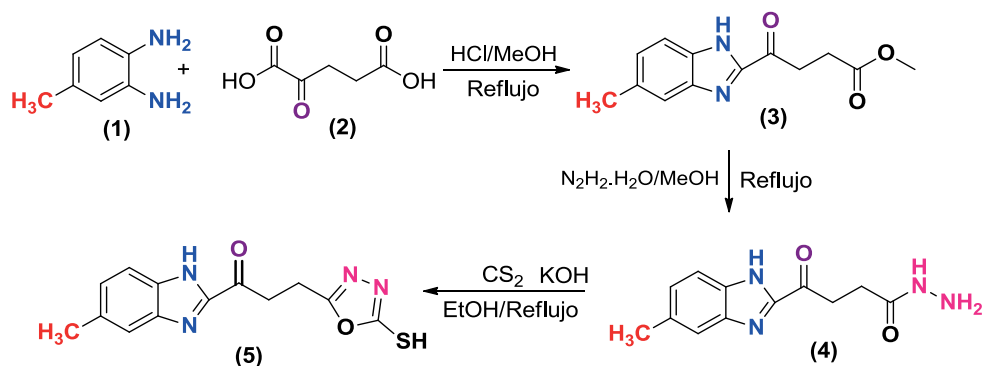


Figura 1. Ruta sintética empleada para obtener el ligando híbrido heteroaromático (benzimidazol/oxadiazol).

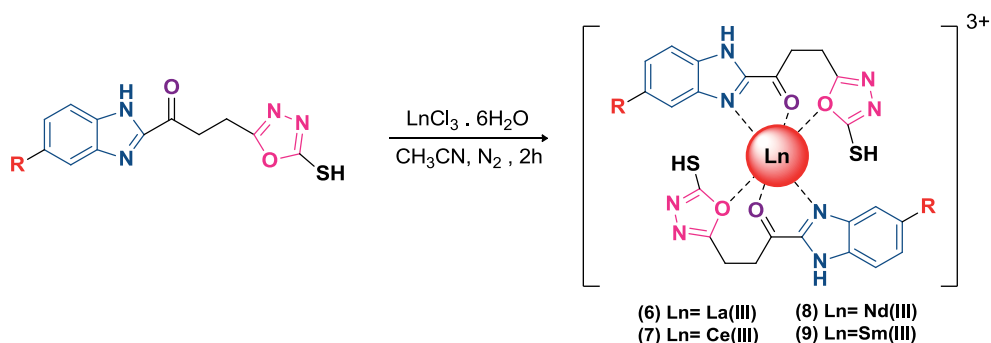


Figura 2. Síntesis de complejos metálicos.

Síntesis de metil 4-(5-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-oxobutanoato (3)

El éster metílico se obtuvo a partir de una modificación de la metodología planteada por Husain [10]. A una solución metanólica (10 mL) de la respectiva *o*-fenilendiamina (1) (0,093 mol·L⁻¹, 0,93 mmol) y ácido 2-cetoglutarico (0,093 mol·L⁻¹, 0,93 mmol) se adicionaron 5 mL de una solución ácida de HCl 5 mol·L⁻¹. La mezcla resultante se mantuvo a reflujo a 70 °C por 48 horas. El sólido obtenido fue filtrado, aislado y lavado 3 veces con agua fría con el objetivo de eliminar residuos polares presentes en el mismo. Sólido blanco. (Rendimiento 207 mg, 90%). Punto de fusión (204 -207 °C). C₁₃H₁₄N₂O₃ (PM 246 g·mol⁻¹). IR cm⁻¹ (ATR, KBr) 3100 (N-H), 1734 (C=O), 1676 (C=N), 1587 (C=C). RMN ¹H [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm]; 2,41 (3H, s, H-4), 2,79 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-11), 3,05 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-12), 3,62 (3H, s, H-15), 7,10 (2H, m, *J* = 8 Hz, H-4 y H-6), 7,58 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-3), 12,30 (1H, s, H-1). EM m/z (%): 246 (M⁺, 100), 231 (M⁺-C₁₂H₁₂N₂O₃); 187 (M⁺-C₁₁H₁₁N₂O); 159 (M⁺-C₉H₇N₂O).

Síntesis de 4-(5-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-oxobutanohidrazida (4)

La hidrazida 4 se sintetizó a partir de la metodología planteada por Husain [10]. A una solución metanólica (10 mL) del éster 3 (0,093 mol·L⁻¹, 0,93 mmol) se adicionó hidrazina monohidratada (1 mol·L⁻¹, 10 mmol) para llevar a reflujo convencional a 65 °C por un periodo de 10 horas. Finalmente, el sólido obtenido fue filtrado, aislado y lavado 3 veces con metanol frío para eliminar el exceso de hidrazina. Sólido blanco. Rendimiento (207 mg, 90%). Punto de fusión (270 - 272 °C). C₁₂H₁₄N₄O₂ (PM 246 g·mol⁻¹). IR cm⁻¹ (ATR, KBr) 3270 (C-H), 1700 (C=O), 1680 (C=N), 1530 (C=C). RMN ¹H [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm]; 2,40 (s, 3H, H-16), 2,49 (s, 2H H-11), 3,00 (t, *J*=8 Hz, 2H, H-12), 4,18 (s, 3H, H-15), 7,10 (m, *J*=8 Hz, 2H, H-4 y H-6), 7,57 (d, *J*=12 Hz, 1H, H-3), 9,30 (s, 1H, H-14), 12,30 (s, 1H, H-1). EM m/z (%): 246 (M⁺, 100), 231 (M⁺-C₁₁H₁₂N₄O₂); 187 (M⁺-C₁₁H₁₁N₂O); 159 (M⁺-C₉H₇N₂O).

Síntesis del ligando 3-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-il)-1-(5-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propanona (5)

El ligando 5 fue obtenido mediante la metodología propuesta por Husain [10]. A una solución etanólica (10 mL) de la respectiva hidrazida 4 (0,1 mol·L⁻¹, 1 mmol) se adicionaron 500 μL de una solución 2 mol·L⁻¹ de KOH (0,1 mol·L⁻¹, 1 mmol) con agitación y calentamiento constante a 50 °C, hasta completa disolución. Posteriormente, a esta mezcla se agregó CS₂ en exceso (0,82 mol·L⁻¹, 8,2 mmol) y se mantuvo a reflujo convencional por 20 horas. Terminado el tiempo de reacción, se ajustó el pH=2 y se adicionaron 20 mL de H₂O, precipitando el compuesto oxadiazólico.

El sólido obtenido fue aislado y lavado varias veces con una solución fría agua/metanol (2:1). Sólido amarillo oscuro. Rendimiento (231 mg, 80%). Punto de fusión (260-262 °C). $C_{13}H_{12}N_4O_2S$ (PM 288 $g \cdot mol^{-1}$). Análisis elemental C 50,7 (cal 54,15), N 18,11 (cal 19,43), H 4,5 (cal 4,2), S 10,5 (cal 11,2). IR cm^{-1} (ATR, KBr), 3630 (S-H), 1640 (C=O), 1545 (C=N). RMN 1H [400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm]; 2,40 (s, 3H, H-19), 3,18 (s, 4H, H-11 y H-12), 7,09 (m, $J=4$ Hz, 12 Hz, 2H, H-4 y H-6), 7,59 (d, $J=8$ Hz, 1H, H-3), 12,34 (s, 1H, H-1), 14,19 (s, 1H, H-18). RMN ^{13}C [400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm]; 21,68 (C19), 22,06 (C12), 28,52 (C11), 115,42 (C4), 125,02 (C6), 128,36 (C3), 130,11 (C2), 132,15 (C7), 140,37 (C5), 155,10 (C13), 158,14 (C9), 164,35 (C10), 178,17 (C16). EM m/z (%): 287 (M^+ , 100), 271 ($M^+ - C_{12}H_9N_4O_2S$); 256 ($M^+ - C_{13}H_{11}N_4O_2$); 239 ($M^+ - C_{13}H_{11}N_4O$); 213 ($M^+ - C_{12}H_{11}N_3O$).

Síntesis de nuevos complejos metálicos derivados del ligando híbrido

Se sintetizaron cuatro complejos lantánidos a partir de los cloruros de La(III), Ce(III), Nd(III), Sm(III) y el ligando híbrido heteroaromático (5). Se adicionó el cloruro de lantánido correspondiente (0,125 $mol \cdot L^{-1}$, 0,5 mmol) a una solución de acetonitrilo (4 mL) del ligando 5 (0,25 $mol \cdot L^{-1}$, 1 mmol), la mezcla se sometió a reflujo (80 °C) por 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se filtró el precipitado y se lavó con una mezcla de metanol/agua en una proporción 1:1. Todos los complejos lantánidos fueron recristalizados en etanol.

Complejo de lantano (6)

Sólido beige. Rendimiento (345 mg, 77%). Punto de fusión (263-265 °C). $C_{26}H_{24}Cl_3LaN_8O_4S_2$ (PM 825,91 $g \cdot mol^{-1}$). Análisis elemental C 36,6 (cal 37,9), N 14,7 (cal 13,6), H 2,3 (cal 2,9), S 7,9 (cal 7,8). La 18,5 (cal 16,9). IR cm^{-1} (ATR, KBr), 2761 (S-H), 1665 (C=O), 1620 (C=N), 453 (La-O). RMN 1H [400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm]; 2,39 (s, 3H, H-19), 3,17 (s, 4H, H-11 y H-12), 7,09 (d, $J=4$ Hz, 8 Hz, 1H, H-4), 7,15 (s, 1H, H-6), 7,55 (d, $J=8$ Hz, 1H, H-3), 12,46 (s, 1H, H-1), 14,35 (s, 1H, H-18). RMN ^{13}C [400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm]; 21,69 (C19), 22,05 (C12), 28,54 (C11), 115,50 (C4), 124,99 (C6), 128,32 (C3), 130,11 (C2), 132,21 (C7), 140,32 (C5), 155,06 (C13), 158,15 (C9), 164,28 (C10), 178,08 (C16). Λ (DMSO, 28 °C) ($\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$): 210. TGA pérdida de masa 0,42% (87-91 °C, 1 paso, calc. 0,2 $H_2O = 0,42\%$), 14,43% (99-313 °C, 1 paso, calc. $2 \times SH = 14,63\%$), 18,66% (313-550 °C, 1 paso, calc. Formación de $La_2O_2CO_3 = 22,64\%$).

Complejo de cerio (7)

Sólido beige. Rendimiento (345 mg, 76%). Punto de fusión (265-268 °C). $C_{26}H_{26}CeCl_3N_8O_5S_2$ (PM 841,12 $g \cdot mol^{-1}$). Análisis elemental C 36,2 (cal 37,9), N 15,9 (cal 13,6), H 4,4 (cal 2,9), S 7,0 (cal 7,8), Ce 18,9 (cal 16,7). IR cm^{-1} (ATR, KBr), 3515

(S-H), 1648 (C=O), 1547 (C=N), 452 (Ce-O). Λ (DMSO, 28 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 208. TGA pérdida de masa 2,1% (25-82 °C, 1 paso, calc. 1,0 H₂O = 2,1%), 15,22% (97-295 °C, 1 paso, calc. 2×SH = 14,23%), 19,92% (295-550 °C, 1 paso, calc. formación de Ce₂O₂CO₃ = 21,12%).

Complejo de neodimio (8)

Sólido café. Rendimiento (340 mg, 75%). Punto de fusión (263-265 °C). C₂₈H₃₁Cl₃N₉NdO₆S₂ (PM 830,85 g·mol⁻¹). Análisis elemental C 36,7 (cal 37,7), N 14,2 (cal 13,5), H 3,7 (cal 2,9), S 7,8 (cal 7,7) Nd 17,8 (cal 17,44). IR cm⁻¹ (ATR, KBr), 3583 (S-H), 1653 (C=O), 1551 (C=N), 437 (Nd-O). Λ (DMSO, 28 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 205. TGA pérdida de masa 15,08% (150-287 °C, 1 paso, calc. 2×SH = 14,96%), 29,07% (300-500 °C, 1 paso, calc. formación de Nd₂O₂CO₃ = 27,34%).

Complejo de samario (9)

Sólido amarillo oscuro. Rendimiento (320 mg, 70%). Punto de fusión (267-269 °C). C₂₈H₃₃Cl₃N₉SmO₇S₂ (PM 910,37 g·mol⁻¹). Análisis elemental C 36,9 (cal 36,9), N 14,5 (cal 13,8), H 3,8 (cal 3,4), S 7,8 (cal 7,04) Sm 19,2 (cal 16,5). IR cm⁻¹ (ATR, KBr), 3574 (S-H), 1653 (C=O), 1549 (C=N), 457 (Sm-O). Λ (DMSO, 28 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 210. TGA pérdida de masa 2,35% (39-83 °C, 1 paso, calc. 0,5 CH₃CN = 2,39%), 10,33% (242-296 °C, 1 paso, calc. 2×SH = 9,55%), 32,65% (315,90-497,08 °C, 1 paso, calc. formación de Sm₂O₂CO₃ = 30,10%).

Estudio de la actividad antioxidante

Siguiendo la metodología planteada de Sdiri [11] se evaluó la actividad antioxidante expresada como porcentaje de captación de radicales libres (%FRS, por sus siglas en inglés free radical scavenging) de los compuestos sintetizados empleando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·), frente a los estándares antioxidantes de vitamina C y quercetina. Este procedimiento se realizó en placa de 96 pocillos, donde el ligando y los complejos sintetizados se adicionaron desde la columna 1 a la columna 11 en un rango de concentraciones entre 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y en la columna 12 se adicionó el blanco DPPH· metanol. Finalmente, después de 1 hora se realizó la lectura de las placas con el programa M965 y los resultados se desarrollaron en el programa GraphPad Prism 7. El experimento se realizó por triplicado y el valor promedio fue calculado. Los resultados se expresaron en porcentaje de la actividad de captación del radical libre DPPH· empleando la siguiente ecuación:

$$\%FSR = \left[\frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100$$

Donde A_c es la absorbancia del control y A_s la absorbancia de los compuestos. La concentración de las muestras que inhiben el 50% de radicales DPPH· expresados en %FRS₅₀ fue calculada mediante una regresión no lineal y reportada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estudio electroquímico

Estudios de voltametría cíclica (VC) y voltametría de onda cuadrada (SWV) fueron llevados a cabo para complementar los resultados obtenidos mediante la captación del radical libre DPPH·. Para esto, se realizaron medidas de corriente en función del potencial, a una velocidad de barrido de $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Se empleó como solvente DMF seco, hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (NBu_4PF_6) como electrolito soporte, una barra de carbono vítreo como electrodo de trabajo, un cable de platino como electrodo auxiliar y un alambre de plata como electrodo de pseudoreferencia. Los compuestos evaluados se trabajaron a una concentración de $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y los valores fueron calibrados respecto a la pareja de ferroceno/ferricinio (Fc/Fc^+) como estándar interno.

Actividad antibacteriana: determinación de la concentración mínima inhibitoria

Empleando el método recomendado por el CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) [12] se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en 5 cepas bacterianas Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *K. pneumoniae* ATCC 2146 y cepas clínicas *S. dysenteriae* y *Salmonella* sp) y dos cepas bacterianas Gram positivas (*B. subtilis* ATCC 6633 y *S. aureus* ATCC 6538), suministradas por la unidad de microbiología del complejo de salud pública Aníbal Patiño Rodríguez de la ciudad de Santiago de Cali.

Las cepas bacterianas se replicaron en un cultivo de agar chocolate en condiciones aerobias, a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se preparó el inóculo para lo cual se aislaron las colonias de bacterias de la respectiva cepa de trabajo y se suspendieron en caldo Mueller-Hinton hasta obtener una disolución con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland para posteriormente preparar la solución madre de la bacteria a una concentración aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

Posteriormente, se tomó una alícuota de la solución madre y se disolvió en caldo Mueller-Hinton, obteniendo de esta manera la solución de trabajo para cada microorganismo patógeno. Se depositaron por triplicado los compuestos en placas de 96 pocillos. En la columna 1 se depositó el control positivo (caldo Mueller-Hinton y solución bacteriana), en la columna 12 el control negativo caldo Mueller-Hinton) y en los pocillos restantes se depositaron los compuestos antibacterianos en un rango de concentración entre $1,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Finalmente, cada una de las placas se incubó a 37°C .

°C por un periodo de 24 horas en condiciones aerobias para así obtener los resultados de la CMI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización

La síntesis del compuesto 3 se realizó a través de dos reacciones. En primer lugar se formó el anillo benzimidazólico en medio ácido para favorecer la sustitución nucleofílica de la *o*-fenilendiamina sobre el carbono carbonílico del ácido α -cetoglutarico [13], para posteriormente mediante una reacción de esterificación de Fisher obtener 3 con un rendimiento del 90%. Se realizó la amidación del éster metílico 3 utilizando un exceso (1:10) de hidrazina monohidratada, para obtener mediante una sustitución nucleofílica el sólido blanco cristalino correspondiente a la hidrazida 4. Finalmente, el ligando híbrido heteroaromático (benzimidazol/oxadiazol) 5 se obtuvo con un rendimiento del 80%, a partir de la reacción en medio etanólico de 4 con un exceso de sulfuro de carbono, como un sólido cristalino amarillo [14].

Los compuestos orgánicos 3-5 fueron aislados y caracterizados mediante punto de fusión, análisis elemental, espectroscopias IR, RMN- ^1H y ^{13}C (mono y bidimensional, ver anexos), y espectrometría de masas. En la figura 3 se muestran, como ejemplo comparativo, los espectros FT-IR de 3-5 con las bandas principales asignadas a los grupos funcionales de estos compuestos. La formación del anillo benzimidazólico se evidenció por la presencia de las bandas de vibración de tensión (N-H) y del grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ a 3100 cm^{-1} y 1734 cm^{-1} , respectivamente. Además, para el compuesto 3 fueron asignadas las bandas de vibración de tensión simétrica y asimétrica (C-O-C), propias del éster metílico. En el espectro infrarrojo del compuesto 4 se observaron las bandas de vibración de tensión (3270 cm^{-1}) y de deformación fuera del plano (891 cm^{-1}), que evidenciaron la formación de un nuevo enlace (N-H). Además de conservar la banda correspondiente a la vibración de tensión $\nu(\text{C}=\text{O})$ a 1700 cm^{-1} .

Finalmente, en el espectro de FT-IR del compuesto 5 se observó la banda de vibración de tensión del enlace $\nu(\text{S-H})$ a 3630 cm^{-1} , que demuestra la formación en estado sólido del tautómero tiol [15]. Se confirmó la formación del anillo 1,3,4-oxadiazólico, por la presencia de nuevas bandas de vibración de tensión simétrica y asimétrica $\nu(\text{C-O-C})$ características del grupo éter a 941 cm^{-1} y 965 cm^{-1} . Además, se observó un corrimiento batocrómico en la banda de vibración de tensión del grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ a 1640 cm^{-1} , posiblemente a consecuencia del efecto resonante proporcionado por el anillo benzimidazólico.

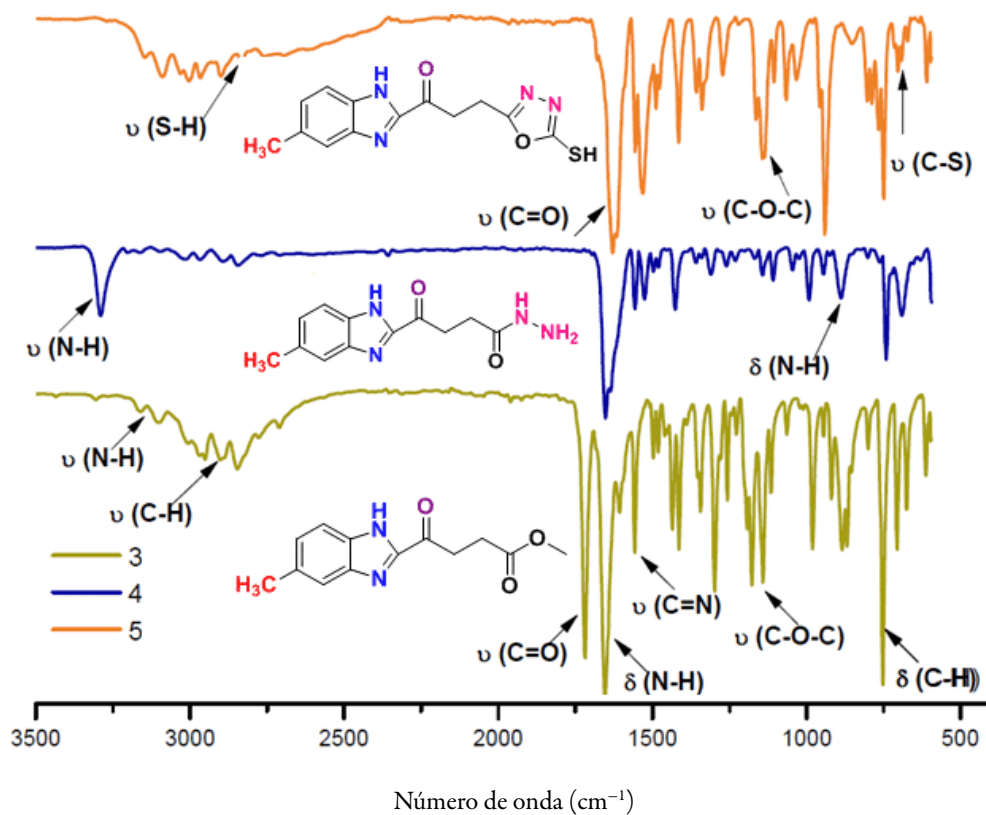


Figura 3. Espectros de infrarrojo FT-IR de los compuestos 3, 4 y 5.

En el análisis del espectro de RMN-¹H del compuesto 5 (ver figura 4), se asignó un singlete a campo alto (δ 2,40 ppm) correspondiente a los tres protones del grupo metilo unido al anillo aromático, un multiplete a δ 7,09 ppm que integra para los protones H-4 y H-6, un doblete a δ 7,59 ppm asignado al protón H-3, y a campo más bajo (δ 12,34 ppm y δ 14,19 ppm) se observaron dos singletes asignados a los protones del anillo imidazólico H-1 y del anillo oxadizólico H-18. El protón H-18 se encuentra a campo más bajo debido al efecto resonante que ejerce el grupo tiol, en el anillo heterocíclico 1,3,4-oxadiazol. También se observa un falso singlete a 3,18 ppm el cual corresponde al solapamiento de los tripletes asignados para los protones H-11 y H-12, este hecho ocurre debido a la similitud que poseen los protones en sus ambientes magnéticos.

La caracterización de los complejos lantánidos se realizó mediante análisis elemental (C, N, H y S), contenido de metal por complexometría, espectroscopia IR, RMN-¹H y ¹³C, análisis termogravimétrico y medición de conductividad molar. Los resultados del análisis elemental y complexometría sugieren una relación 2:1 (ligando:metal). Mien-

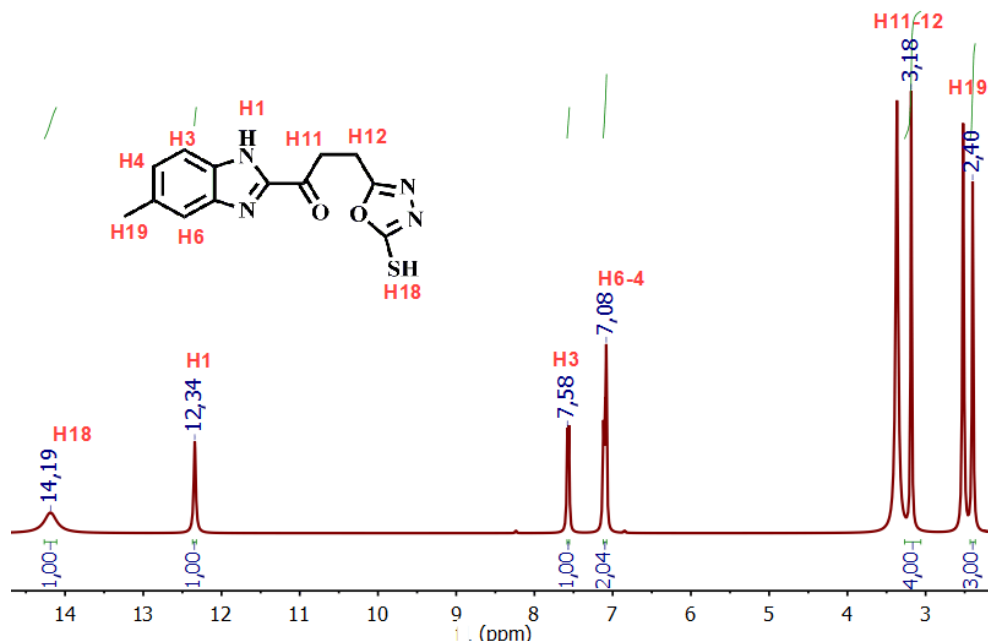


Figura 4. Espectro de RMN-¹H del compuesto 5.

tras que los valores de conductividad molar en DMF a 25°C (entre $200 \Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ y $210 \Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$) evidencian la naturaleza electrolítica para todos los complejos [16].

En la figura 5 se presentan los espectros FT-IR comparativos de los compuestos 5 y 6. Para el complejo metálico 6 se observaron corrimientos químicos de las bandas principales indicando el posible modo de coordinación entre el ligando y el ion lantánido. Los desplazamientos hipsocrómico de 1640 cm^{-1} a 1665 cm^{-1} , y de 1545 cm^{-1} a 1620 cm^{-1} de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ y amino $\nu(\text{C}=\text{N})$, respectivamente; el corrimiento batocrómico de la banda de vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C}-\text{S})$, además de la presencia de las bandas a 585 cm^{-1} $\nu(\text{La}-\text{N})$ y 464 cm^{-1} $\nu(\text{La}-\text{O})$ [17], muestra que el ligando híbrido 5 actúa como agente quelante tridentado a través del grupo carbonilo y los heteroátomos de nitrógeno y oxígeno de los anillos de benzimidazol y oxadiazol, respectivamente.

En el espectro de RMN-¹H del complejo 6 se observaron los desplazamientos a campo bajo (δ 14,35 ppm y δ 12,46 ppm) de los protones H-18 y H-1, correspondientes a los anillos 1,3,4-oxadiazol y benzimidazólico, respectivamente (ver figura 6) [17, 18]. Se observa que el multiplete asignado para los protones H-6 y H-4 en el ligando libre, se resuelve como un doblete y un singlete, en donde el protón H-6 sufre mayor

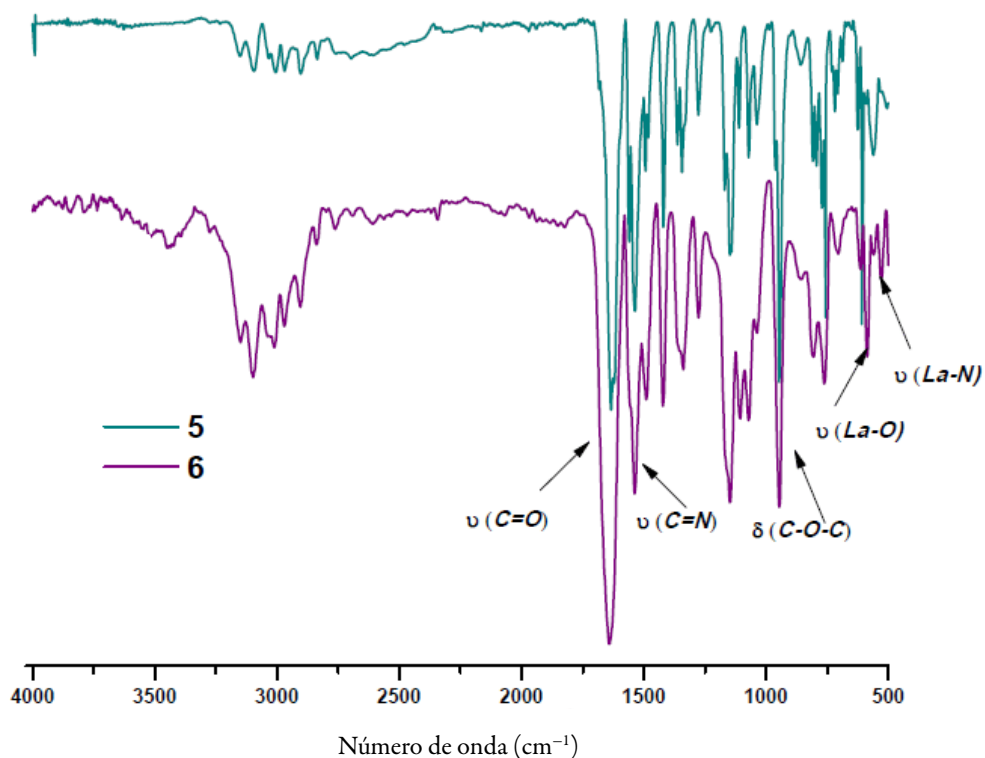


Figura 5. Espectros de infrarrojo FT-IR de los compuestos 5 y 6.

desapantallamiento apareciendo a campo más bajo (δ 7,15 ppm), como consecuencia del enlace entre el anillo benzimidazólico y el ion lantánido. También, comparando los datos de RMN¹³C del ligando 5 y del complejo 6, se observa que el carbono C-7, C9 y C2 presentes en el anillo benzimidazólico se desplazan a campo más bajo, debido al efecto inductivo que el centro metálico genera al coordinarse a través de este grupo.

El análisis espectroscópico evidencia el efecto sobre el desplazamiento químico, que ocurre cuando se coordina el centro metálico al ligando orgánico derivado de anillos heteroaromáticos. El corrimiento hacia campo bajo de las señales asignadas a los protones y átomos de carbono cercanos a los grupos carbonilo, amino y oxadiazol confirma que el ligando híbrido coordina de forma tridentada a los iones metálicos.

La caracterización de los complejos lantánidos se complementó con estudios de termogravimetría que permitieron identificar el grado de hidratación, así como la formación de carbonatos óxidos del metal correspondiente, lo cual es común encontrar como productos de descomposición térmica para este tipo de iones metálicos con ligandos orgánicos [19, 21]. El estudio termogravimétrico sugiere que sólo los complejos de lantano

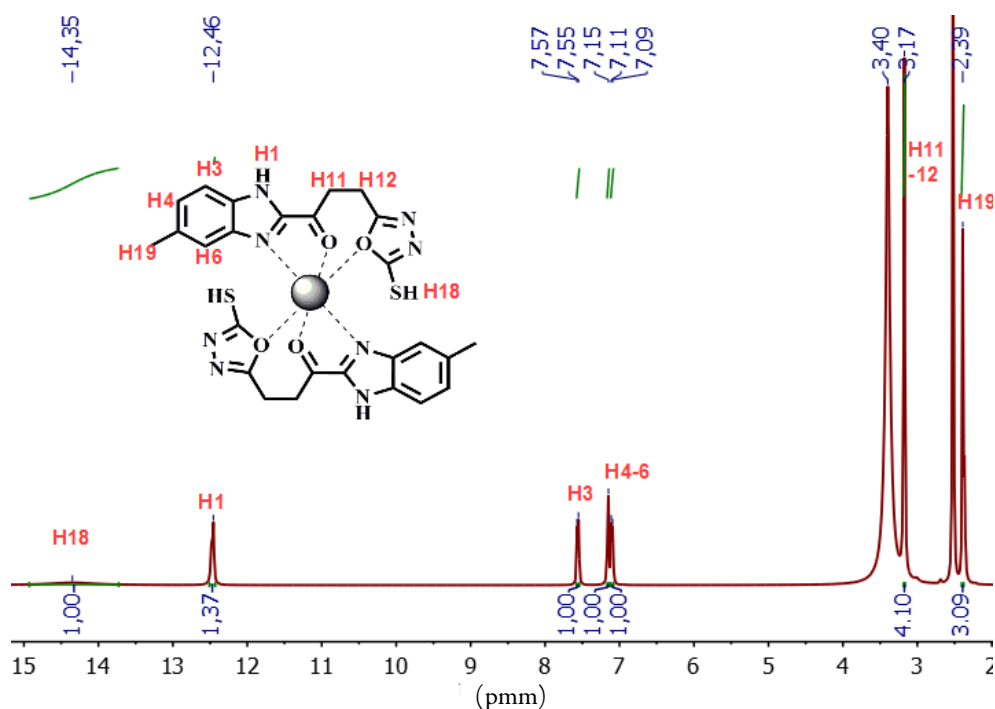


Figura 6. Espectro de RMN¹H del complejo de lantano (6).

y cerio presentan aguas de hidratación, en una relación de 0,2 y 1,0 respectivamente, y en todos los casos se observa una pérdida de masa hasta cerca de 300 °C en un solo paso que corresponde en masa a los dos grupos –SH presentes en cada molécula de complejo (un grupo de cada ligando), resultado acorde a los compuestos propuestos del tipo [LnL₂]Cl₃. Se puede observar, además, que sólo para el caso del complejo de samario, se da una primera pérdida de masa del 2,35%, que correspondió a 0,5 de una molécula de acetonitrilo proveniente del solvente en el que se realizaron las reacciones de síntesis (ver anexos).

Evaluación farmacológica

Debido a su amplio rango de actividades biológicas, los compuestos derivados de los núcleos benzimidazol u oxadiazol han generado un especial interés en la química medicinal, ya que estudios recientes muestran la selección de este tipo de estructuras como farmacóforos para el desarrollo de nuevos agentes bioactivos con potencial capacidad antioxidante y antibacteriana, lo cual muestra prometedores resultados en el diseño racional de nuevos fármacos.

Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son especies químicas altamente inestables que tienen en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que los hace potenciales generadores de otros radicales libres a través de reacciones en cadena. En condiciones óptimas, los organismos vivos mantienen como mecanismo de defensa un equilibrio homeostático entre las ROS y los antioxidantes endógenos, aunque un desbalance entre ellos puede generar estrés oxidativo causando daño a componentes celulares importantes como las proteínas, los ácidos nucleicos, los lípidos, el ADN y los carbohidratos. Estas especies radicalarias están asociadas en procesos fisiopatológicos de enfermedades crónicas y degenerativas como cáncer, diabetes, artritis reumatoide, cataratas, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, entre otras. De ahí la importancia de considerar el estrés oxidativo como diana terapéutica para el desarrollo de agentes terapéuticos antioxidantes con el potencial de inhibir procesos radicalarios nocivos para la salud.

La actividad antioxidante de los compuestos sintetizados se realizó mediante el ensayo *in vitro* de captación del radical libre DPPH·, el cual es un radical estable que reacciona con moléculas que puedan donar protones o hidrógenos radicalarios generando una disminución en la intensidad del color púrpura y la absorbancia de la solución [22].

En la figura 7 se muestran los porcentajes de captación de radicales libres (% FRS) de los compuestos evaluados en función de la concentración. También se observa de manera general que tanto el ligando como los complejos lantánidos presentan altos porcentajes de inhibición del radical DPPH· a bajas concentraciones, encontrándose valores muy similares a los estándares antioxidantes utilizados como referencia. Este resultado puede ser consecuencia principalmente a dos factores: (i) según la teoría HSAB (*hard and soft acids and bases*), los iones lantánidos son considerados ácidos duros de Lewis y por tanto tienden a formar enlaces fuertes con bases duras de Lewis como los átomos de oxígeno y nitrógeno (presentes en los anillos benzimidazólico y oxadiazólico). Debido a esto, cuando el centro metálico, con alta densidad de carga positiva, interactúa con el ligando genera la polarización y la ionización del enlace del grupo -SH (ver figura 8) [23], generando especies radicalarias estables, a través del mecanismo de reacción HAT (*hydrogen atom transfer*). Los resultados mostraron que los complejos metálicos tienen un mayor porcentaje de captación de radicales libres (%FRS) en relación al ligando libre, lo que muestra el efecto sinérgico al formarse los complejos de coordinación; y (ii) que los compuestos sintetizados puedan estabilizar la carga generada, una vez han donado sus protones, mediante la deslocalización de la

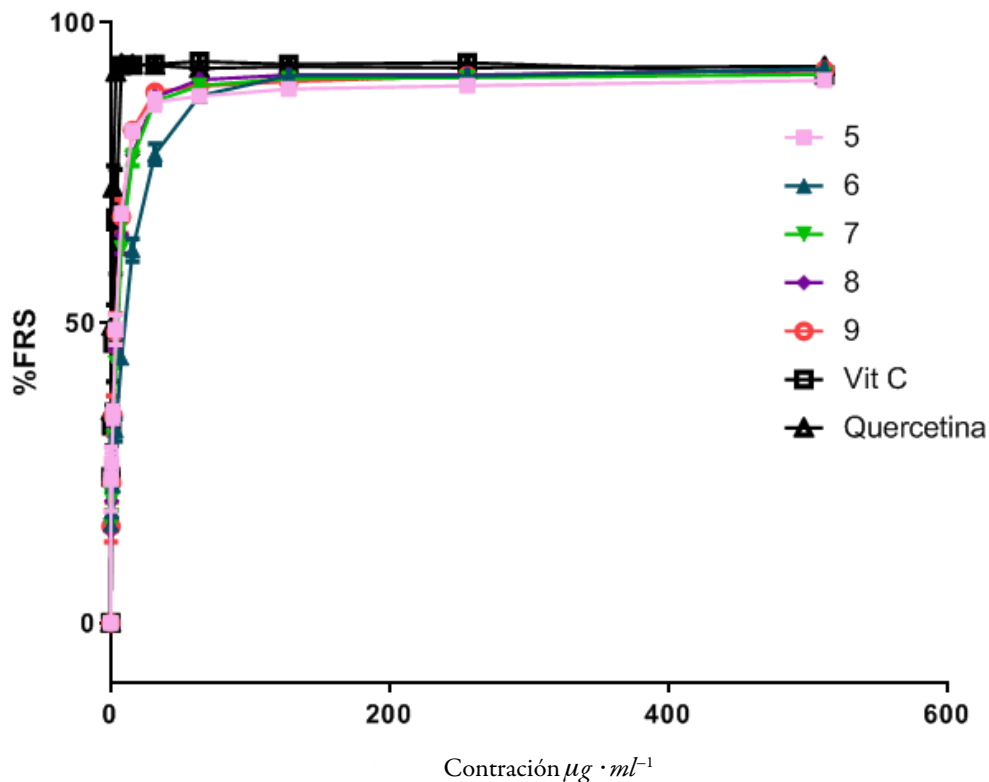


Figura 7. Porcentaje de captación de radicales libres para los compuestos evaluados. Los valores son el promedio de tres réplicas.

misma en los anillos heterocíclicos 1,3,4-oxadiazol y el benzimidazol, presentes en la estructura de los compuestos [24].

Igualmente, se observó el efecto que tiene el radio iónico sobre la actividad de captación de radicales libres en los compuestos evaluados, se encontró en el compuesto 9 que a concentraciones más bajas se obtienen mayores porcentajes de inhibición en relación con los otros complejos metálicos. Esto se debe fundamentalmente a que los cationes de samario al tener el radio iónico de menor tamaño (1,079 Å) poseen mayor poder polarizante sobre el enlace -SH, lo que favorece su capacidad antioxidante [25]. Este efecto también se vio reflejado en los valores de %FRS₅₀ encontrados para las muestras evaluadas, obteniendo el menor valor %FRS₅₀ expresado en unidades µg·mL⁻¹ para el complejo 9 (ver figura 9).

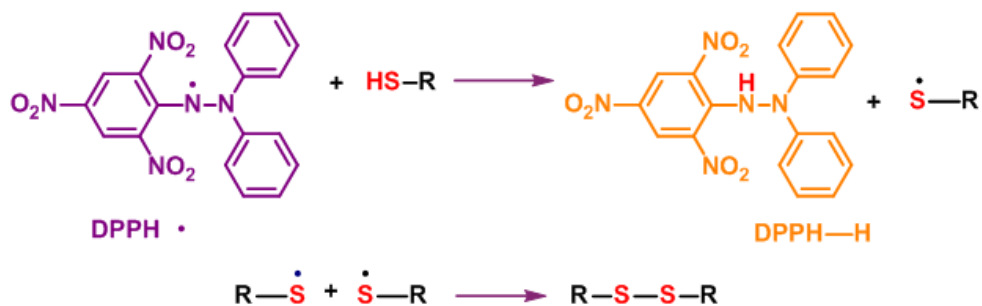


Figura 8. Reacción del mecanismo de eliminación de radicales libres DPPH• mediante el grupo tiol (-SH).

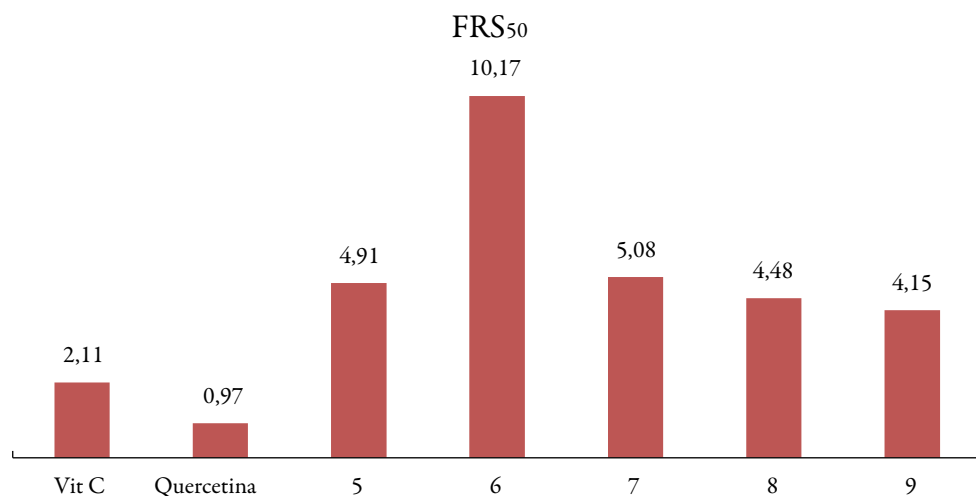


Figura 9. Actividad de captación de radicales libres (%FRS₅₀, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) encontrada para los compuestos 5-9.

Estudios electroquímicos

Con el fin de complementar los resultados de actividad antioxidante proporcionados por el método de reducción del radical DPPH, y considerando que los compuestos antioxidantes presentan bajos potenciales de oxidación, se realizó el estudio electroquímico de los compuestos sintetizados mediante voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada (ver figura 10).

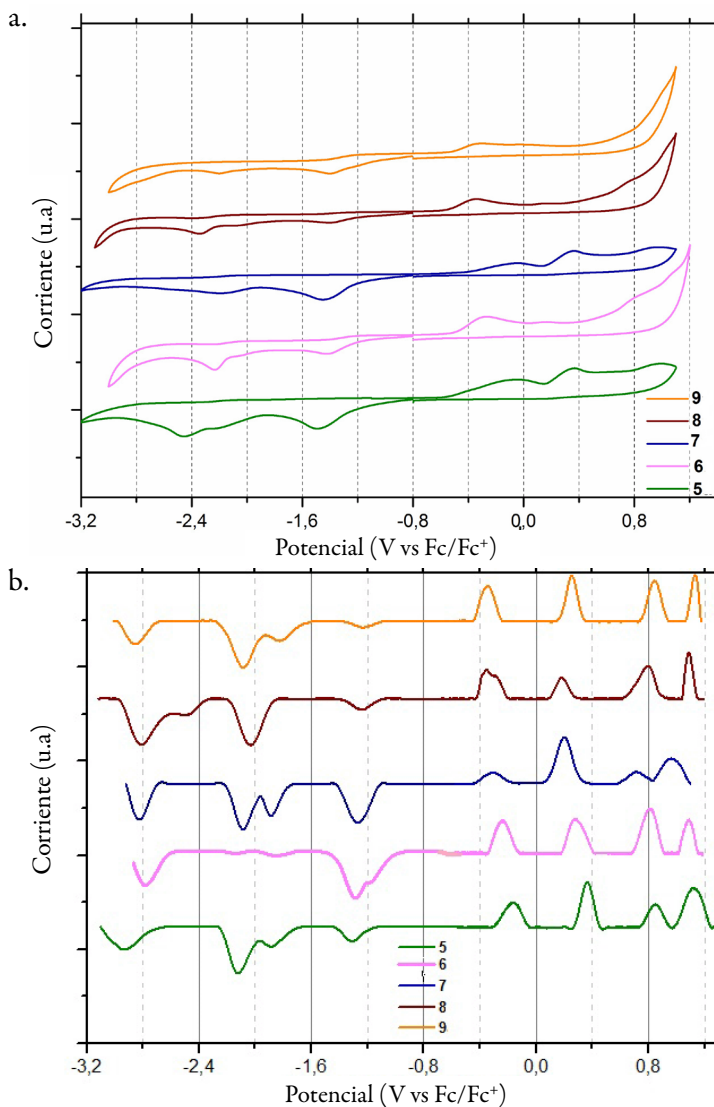


Figura 10. Estudio electroquímico del ligando 5 y sus complejos lantánidos: voltametría cíclica (a) y voltametría de onda cuadrada (b).

La voltametría cíclica (CV) es una técnica electroquímica frecuentemente utilizada (a menudo junto con el ensayo DPPH) para la determinación de compuestos con propiedades antioxidantes. Este procedimiento consiste en un escaneo del potencial desde un valor inicial hasta un valor final vs la corriente. El potencial al que se registra un aumento de la corriente corresponde a la oxidación (o reducción) de una especie en solución. Por

lo tanto, el potencial de oxidación medido por voltametría cíclica se puede tomar como una medida de la facilidad del proceso de oxidación [26]. Específicamente, los bajos potenciales de oxidación están asociados a una mayor facilidad de electrodonación por parte de aquellos compuestos considerados potencialmente antioxidantes [27, 28]. Este mismo resultado se obtiene mediante voltametría de onda cuadrada, sin embargo, posee un menor límite de detección comparada con la voltametría cíclica, por tanto es posible observar con una mayor sensibilidad el proceso redox [29].

De manera general, se observa que el ligando 5 y sus complejos lantánidos presentan cuatro picos de oxidación bajos y cuatro picos de reducción altos, por lo tanto, se consideran compuestos altamente antioxidantes ya que presenta potenciales catódicos por debajo de 0,5 V. Todos los voltamogramas cíclicos de los compuestos sintetizados evidenciaron irreversibilidad, además de presentar un comportamiento electroquímico similar (ver figura 10, izquierda), lo que indica que el proceso redox está centrado en el ligando, por lo tanto, se considera que el ion metálico favorece la actividad antioxidante del ligando al disminuir su potencial de oxidación.

En la figura 10 (izquierda y derecha) se observa que los complejos lantánidos presentan bajos potenciales de oxidación y altos potenciales de reducción respecto al ligando libre, lo que evidencia el efecto sinérgico metal-ligando. Al igual que los resultados obtenidos mediante el ensayo de captación del radical libre DPPH \cdot , en la figura 10 (derecha) se observa que el complejo de samario 9, presentó potencial de oxidación bajo y alto potencial de reducción comparado con los demás complejos lantánidos, indicando que el tamaño del ion metálico favorece la electrodonación. Estos resultados sugieren que el posible mecanismo mediante el cual ocurre la reacción de reducción del radical DPPH \cdot , es una combinación de los mecanismos HAT (*hydrogen atom transfer*) y ET (*electron transfer*), ya que la inhibición de propagación radicalaria puede ocurrir a través de la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón [30].

Estudio de la actividad antibacteriana

La resistencia a los medicamentos antimicrobianos es uno de los mayores desafíos para la química medicinal moderna, ya que existe una creciente necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos con menor toxicidad y actividad farmacológica más potente. Los compuestos derivados del benzimidazol u oxadiazol son una clase importante de compuestos heterocíclicos con un amplio espectro de actividades biológicas, y son farmacóforos comúnmente utilizados en el diseño racional de fármacos, debido a su facilidad para interactuar con diversos biopolímeros que se encuentran en los sistemas vivos.

Se determinaron, mediante ensayos *in vitro*, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) del compuesto orgánico empleado como ligando y sus respectivos complejos lantánidos. Se utilizó el método de microdilución recomendado por el CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), sobre 5 cepas bacterianas Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *K. pneumoniae* ATCC 2146 y cepas clínicas *S. dysenteriae* y *Salmonella* sp) y 2 cepas bacterianas Gram positivas (*B. subtilis* ATCC 6633 y *S. aureus* ATCC 6538). En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de CMI para los compuestos evaluados.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (expresada en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) del ligando 5 y sus respectivos complejos lantánidos 6-9.

| Compuesto | Gram negativas | | | | Gram positivas | | |
|-----------|---------------------------------|---|---|---------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 1705 | <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 2146 | <i>S.</i> <i>dysenteriae</i> | <i>Salmonella</i> sp | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 |
| 5 | >1000 | >1000 | >1000 | 1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| 6 | 800 | >1000 | >1000 | 800 | 800 | >1000 | >1000 |
| 7 | 800 | >1000 | >1000 | 800 | 800 | >1000 | >1000 |
| 8 | 800 | >1000 | >1000 | 800 | 800 | >1000 | >1000 |
| 9 | >800 | >1000 | >1000 | 800 | 800 | >1000 | >1000 |

Los compuestos sintetizados fueron activos principalmente en 3 cepas bacterianas Gram negativas. El ligando (5) inhibió el crecimiento de la cepa *S. dysenteriae*, a una concentración de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y todos los complejos lantánidos presentaron actividad frente a las cepas de *S. dysenteriae*, *Salmonella* sp y *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, con excepción del complejo de samario (9) frente a *E. coli*. De acuerdo con los resultados, se observa que el efecto del tamaño del ion metálico no es significativo en la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas, sin embargo, es posible considerar un efecto sinérgico entre el ligando y el respectivo catión lantánido, al observar que todos los complejos lantánidos presentaron una menor concentración mínima inhibitoria en las cepas *S. dysenteriae* y *Salmonella*, con respecto al ligando libre. Este comportamiento se explica debido al efecto Overtone [31] y la teoría de quelación de Tweedy [32], la cual plantea que en un complejo de coordinación disminuye la polaridad del ion metálico y aumenta la lipofiliidad del complejo, facilitando así, su paso a través de la membrana lipídica de los microorganismos patógenos y una posible inhibición de catálisis enzimática o de la síntesis de ADN.

Es importante resaltar que el anillo benzimidazólico presente en los compuestos puede ejercer un efecto antibacteriano debido a su similitud estructural con la purina, la cual desempeña una labor importante en la biosíntesis de los ácidos nucleicos y proteínas en la pared celular bacteriana. Por tanto, se considera que el benzimidazol es un inhibidor competitivo y pueden reemplazar la purina, bloqueando la biosíntesis de ácido nucleicos, matando o inhibiendo el crecimiento bacteriano [33].

También, se debe considerar que la actividad antibacteriana del anillo benzimidazólico se debe a la inhibición de enzimas que participan en la división celular como la ADN girasa, la inhibición enzimática ocurre mediante la formación de enlaces de hidrógeno del grupo amino NH del anillo y los carboxilatos de los aminoácidos (ASP) de la proteína. De esta manera, a pesar de la coordinación del centro metálico al ligando mediante el heteroátomo del anillo benzimidazol, el compuesto no pierde la capacidad de interactuar con la ADN girasa [34], por lo que es posible considerar que la actividad antibacteriana del ligando y los complejos, se encuentre relacionada con la inhibición de la actividad enzimática durante la síntesis y replicación del ADN.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Valle CI (71095) y al complejo integral de servicios de salud pública Aníbal Patiño Rodríguez, y a la Secretaría de Salud Valle del Cauca por el préstamo de sus instalaciones y donación de las cepas bacterianas para los ensayos microbiológicos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Viegas-Junior, E.J. Barreiro, A. Manssour-Fraga, Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes, *Curr. Med. Chem.*, **14**, 1829-1852 (2007).
2. C. Lazar, A. Kluczyk, T. Kiyota, Y. Konishi, Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method, *J. Med. Chem.*, **47**, 6973-6982 (2004).

3. D. Dolles, M. Nimczick, M. Scheiner *et al.*, Aminobenzimidazoles and structural isomers as templates for dual-acting butyrylcholinesterase inhibitors and hCB2R ligands to combat neurodegenerative disorders, *ChemMedChem*, **11**, 1270-1283 (2016).
4. Y.Q. Hu, C. Gao, S. Zhang *et al.*, Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities, *Eur. J. Med. Chem.*, **139**, 22-47 (2017).
5. H. Bektas, C. Albay, B.B. Sokmen *et al.*, Synthesis, antioxidant, and antibacterial activities of some new 2-(3-fluorobenzyl)-1H-benzimidazole derivatives, *J. Heterocycl. Chem.*, **55**, 2400-2407 (2018).
6. K.K. Gnanasekaran, B. Nammalwar, M. Murie, R.A. Bunce, Efficient synthesis of 1,3,4-oxadiazoles promoted by NH_4Cl , *Tetrahedron Lett.*, **55**, 6776-6778 (2014).
7. M. Madhu-Sekhar, U. Nagarjuna, V. Padmavathi, A. Padmaja, N.V. Reddy, T. Vijaya, Synthesis and antimicrobial activity of pyrimidinyl 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazoles, *Eur. J. Med. Chem.*, **145**, 1-10 (2018).
8. Y. Win, M. Heng, E. Yousif, N. Shalan, Lanthanide complexes of{(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio}acetic acid: Synthesis, characterization and preliminary *in vitro* antibacterial screening activity, *Int. J. Phys. Sci.*, **7**, 43-47 (2012).
9. J.D. Londoño-Mosquera, A. Aragón-Muriel, D. Polo-Cerón, Synthesis, antibacterial activity and DNA interactions of lanthanide(III) complexes of N(4)-substituted thiosemicarbazones, *Univ. Sci.*, **23**, 141-169 (2018).
10. A. Husain, M. Rashid, R. Mishra, S. Parveen, D. S. Shin, D. Kumar, Benzimidazole bearing oxadiazole and triazolo-thiadiazoles nucleus: Design and synthesis as anticancer agents, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **22**, 5438-5444 (2012).
11. S. Sdiri, P. Navarro, A. Monterde, J. Benabda, A. Salvador, Effect of postharvest degreening followed by a cold-quarantine treatment on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity of early-season citrus fruit, *Postharvest Biol. Technol.*, **65**, 13-21 (2012).
12. CLSI, "Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically," in *Clinical and laboratory standards institute*, CLSI, Pennsylvania, 2012, 1.
13. M.P. Alexandra, CCCXVII.-The formation of 2-substituted benzimidazole, *J. Chem. Soc.*, 2393-2399 (1928).

14. A. Ur-Rehman, K. Nafeesa, *1,3,4-OXADIAZOLE: Synthesis of Derivatives with Antioxidant & Enzyme Inhibition Activities*, Pharmamedix Indian, Rajasthan, 2014, 18.
15. R.V. Patel, P.K. Patel, P. Kumari, D.P. Rajani, K.H. Chikhaliya, Synthesis of benzimidazolyl-1,3,4-oxadiazol-2ylthio-N-phenyl (benzothiazolyl) acetamides as antibacterial, antifungal and antituberculosis agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **53**, 41-51 (2012).
16. W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.*, **7**, 81-122 (1971).
17. S.C. Dmphen, Preparation, photoluminescent behaviour, antimicrobial and antioxidant properties of new orange light emitting Sm (III), **4**, 869-876 (2018).
18. A. Husain, M. Rashid, M. Shaharyar, A.A. Siddiqui, R. Mishra, Benzimidazole clubbed with triazolo-thiadiazoles and triazolo-thiadiazines: New anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **62**, 785-798 (2013).
19. V. M. Patel, N. B. Patel, M. J. Chan-Bacab, G. Rivera, Synthesis, biological evaluation and molecular dynamics studies of 1,2,4-triazole clubbed Mannich bases, *Comput. Biol. Chem.*, **76**, 264-274 (2018).
20. A. Aragón-Muriel, D. Polo-Cerón, Synthesis, characterization, thermal behavior, and antifungal activity of La(III) complexes with cinnamates and 4-methoxyphenylacetate, *J. Rare Earths*, **31**, 1106-1113 (2013).
21. A. Aragón-Muriel, Y. Upegui, J.A. Muñoz, S.M. Robledo, D. Polo-Cerón, Synthesis, characterization and biological evaluation of rare earth complexes against tropical diseases leishmaniasis, malaria and trypanosomiasis, *Avanc. Quim.*, **11**, 53-61 (2016).
22. G. Tirzitis, G. Bartosz, Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights- Review, *Acta Biochim. Pol.*, **54**, 139-142 (2010).
23. Z.A. Taha, A.M. Ajlouni, W. Al Momani, A.A. Al-Ghzawi, Syntheses, characterization, biological activities and photophysical properties of lanthanides complexes with a tetradentate Schiff base ligand, *Spectrochim. Acta-Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **81**, 570-577 (2011).

24. N. Mihailović, V. Marković, I.Z. Matić *et al.*, Synthesis and antioxidant activity of 1,3,4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids, *RSC Adv.*, **7**, 8550-8560 (2017).
25. M.N. Gueye, M. Dieng, I.E. Thiam *et al.*, Lanthanide (III) complexes with tridentate Schiff base ligand, antioxidant activity and X-ray crystal structures of the Nd (III) and Sm (III) complexes, *J. Sabinet African*, **70**, 8-15 (2017).
26. M. Miceli, E. Roma, P. Rosa *et al.*, Synthesis of Benzofuran-2-one derivatives and evaluation of their antioxidant capacity by comparing DPPH assay and cyclic voltammetry, *Molecules*, **23**, E710 (2018).
27. J.F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J.M. Rodríguez-Mellad, Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles, *Molecules*, **17**, 5126-5138 (2012).
28. J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova *et al.*, Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **8**, 8464-8489 (2013).
29. J.C. Helfrick, L.A. Bottomley, Cyclic square wave voltammetry of single and consecutive reversible electron transfer reactions, *Anal. Chem.*, **81**, 9041-9047 (2009).
30. R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanolu, Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays, *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 997-1027 (2016).
31. R. Prabhakaran, S.V. Renukadevi, R. Karvembu *et al.*, Structural and biological studies of mononuclear palladium(II) complexes containing N-substituted thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 268-273 (2008).
32. B.G. Tweedy, Plant extracts with metal ions as potential antimicrobial agents, *Phytopathology*, **55**, 910-918 (1964).
33. D. Song, S. Ma, Recent development of benzimidazole-containing antibacterial agents, *Chem. Med. Chem.*, **11**, 646-659, (2016).
34. S. Hameed, A. Raichurkar, P. Madhavapeddi *et al.*, Benzimidazoles: Novel mycobacterial gyrase inhibitors from scaffold morphing, *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 820-825 (2014).

ANEXOS

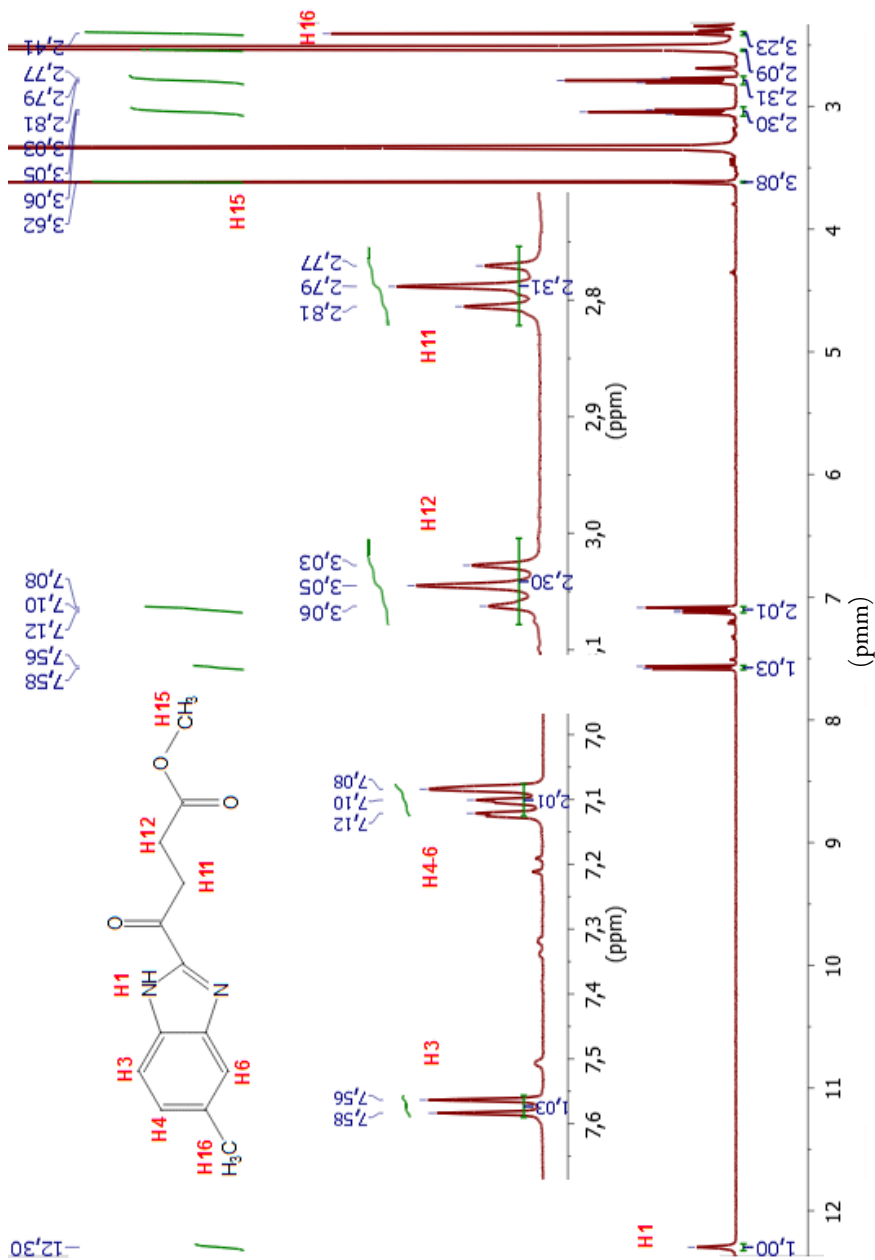


Figura 11. Espectro de RMN¹H del compuesto (3).

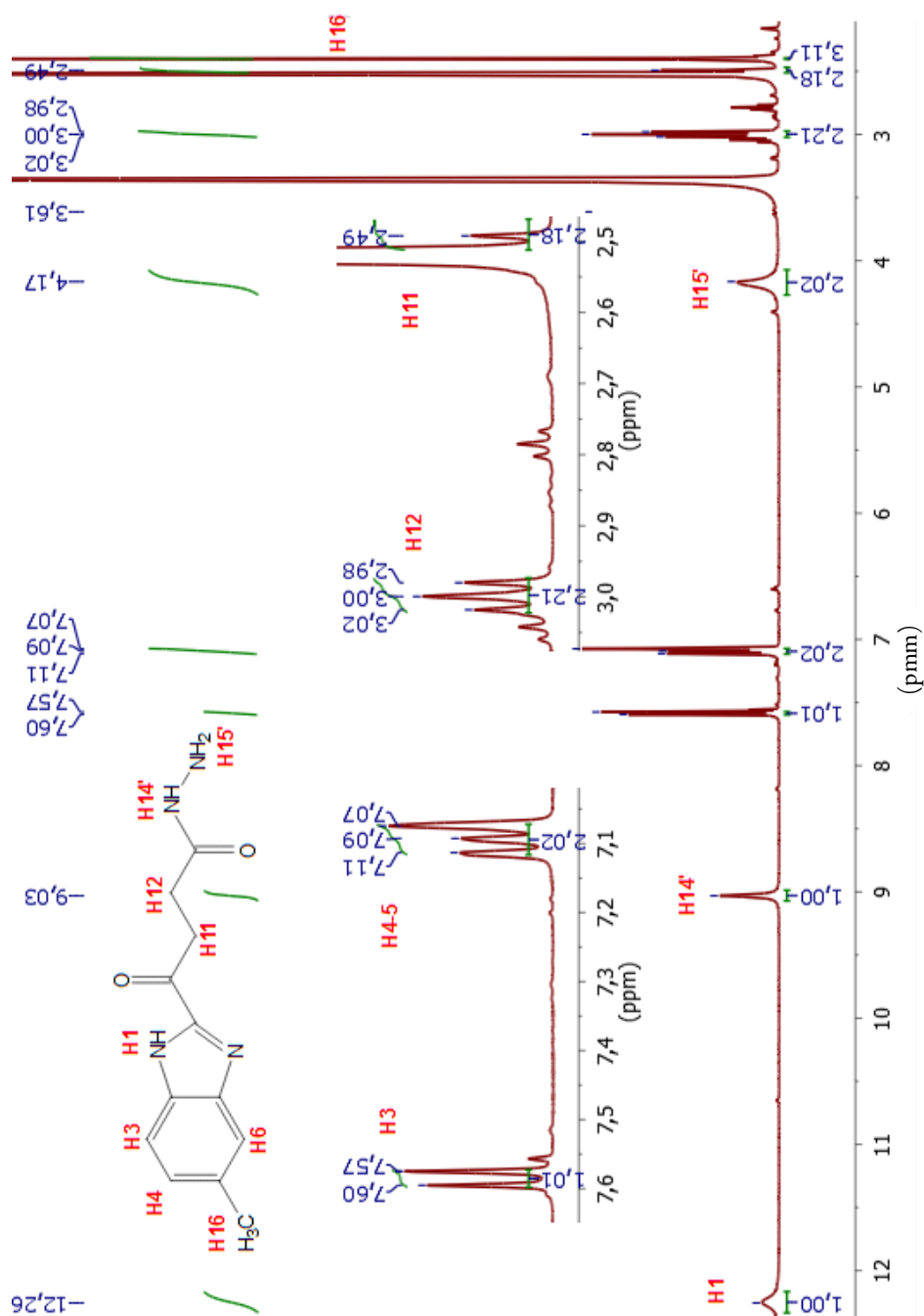


Figura 12. Espectro de RMN-¹H del compuesto (4).

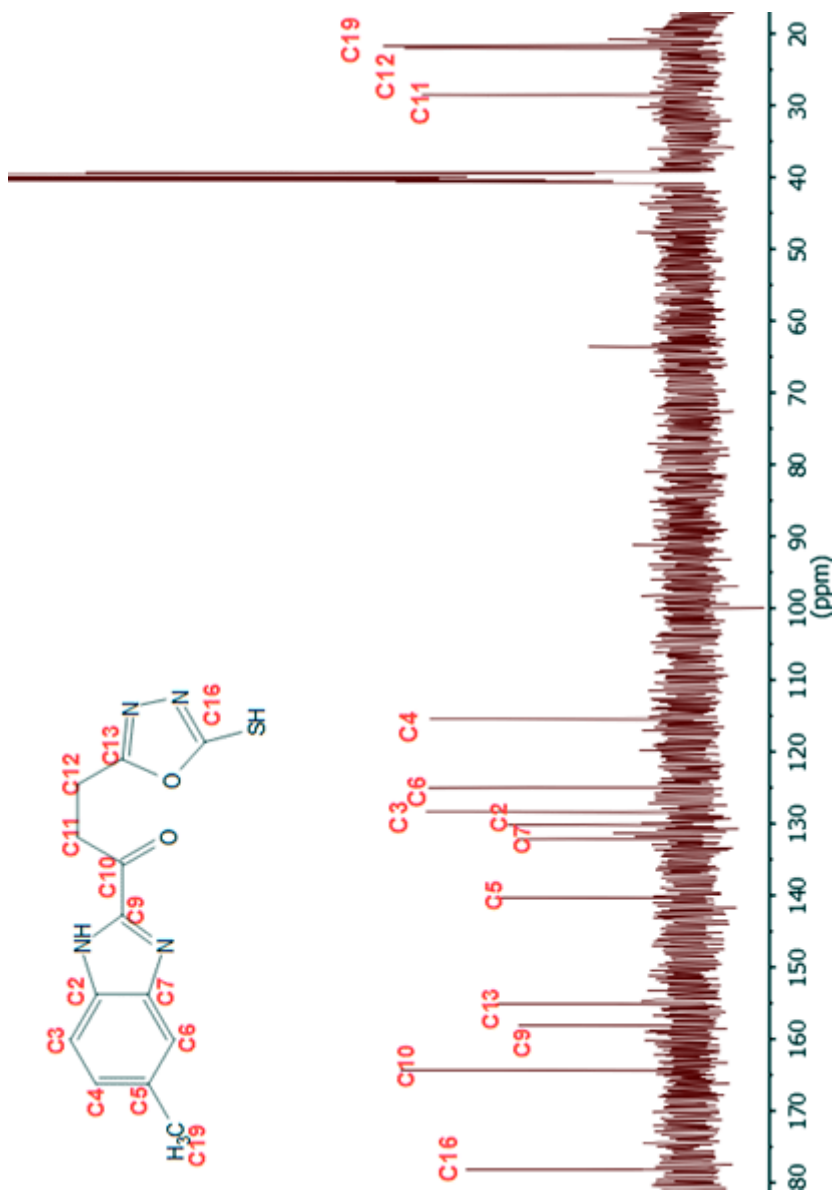


Figura 13. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto (5).

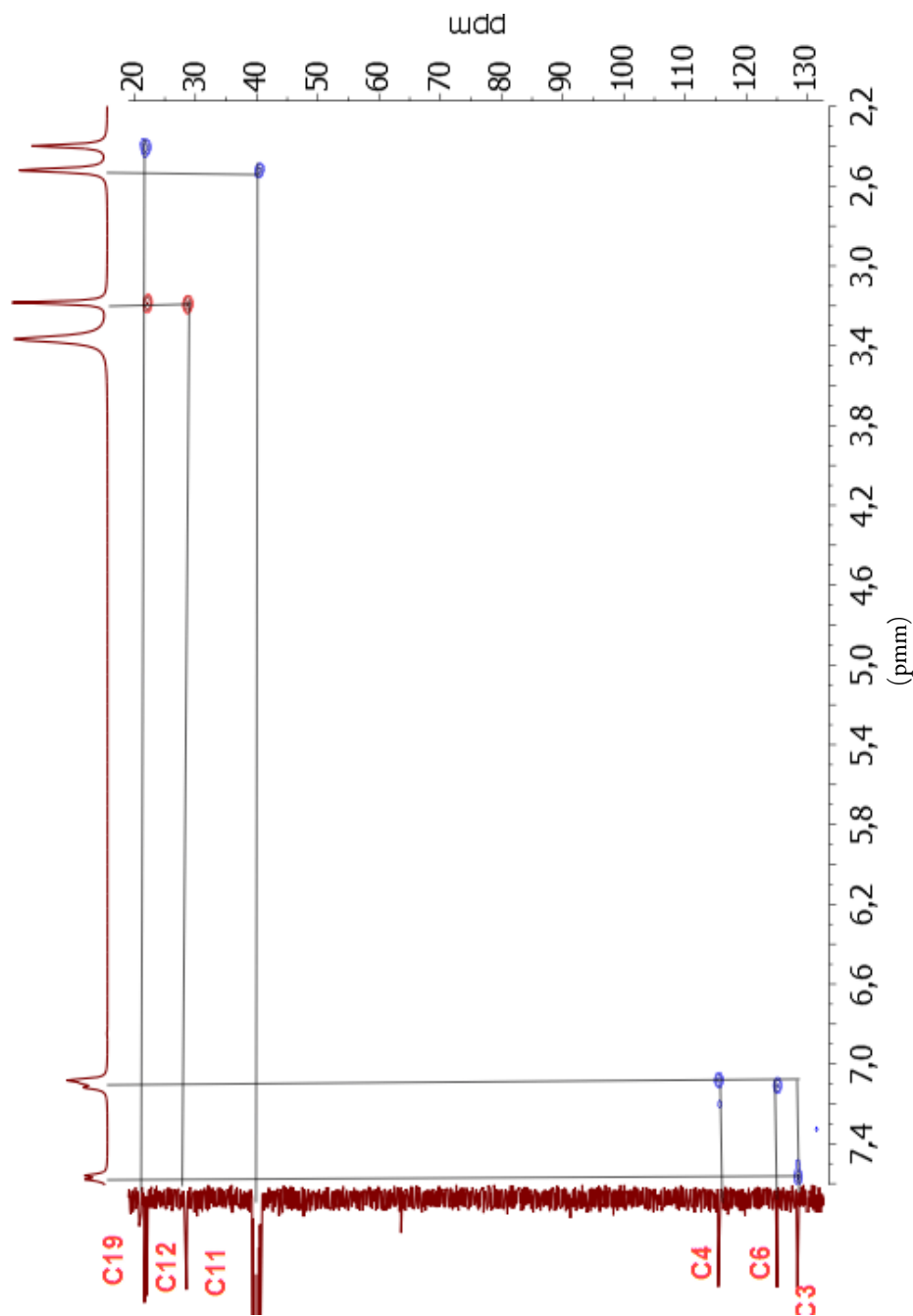


Figura 14. Espectro de HSQC del compuesto (5).

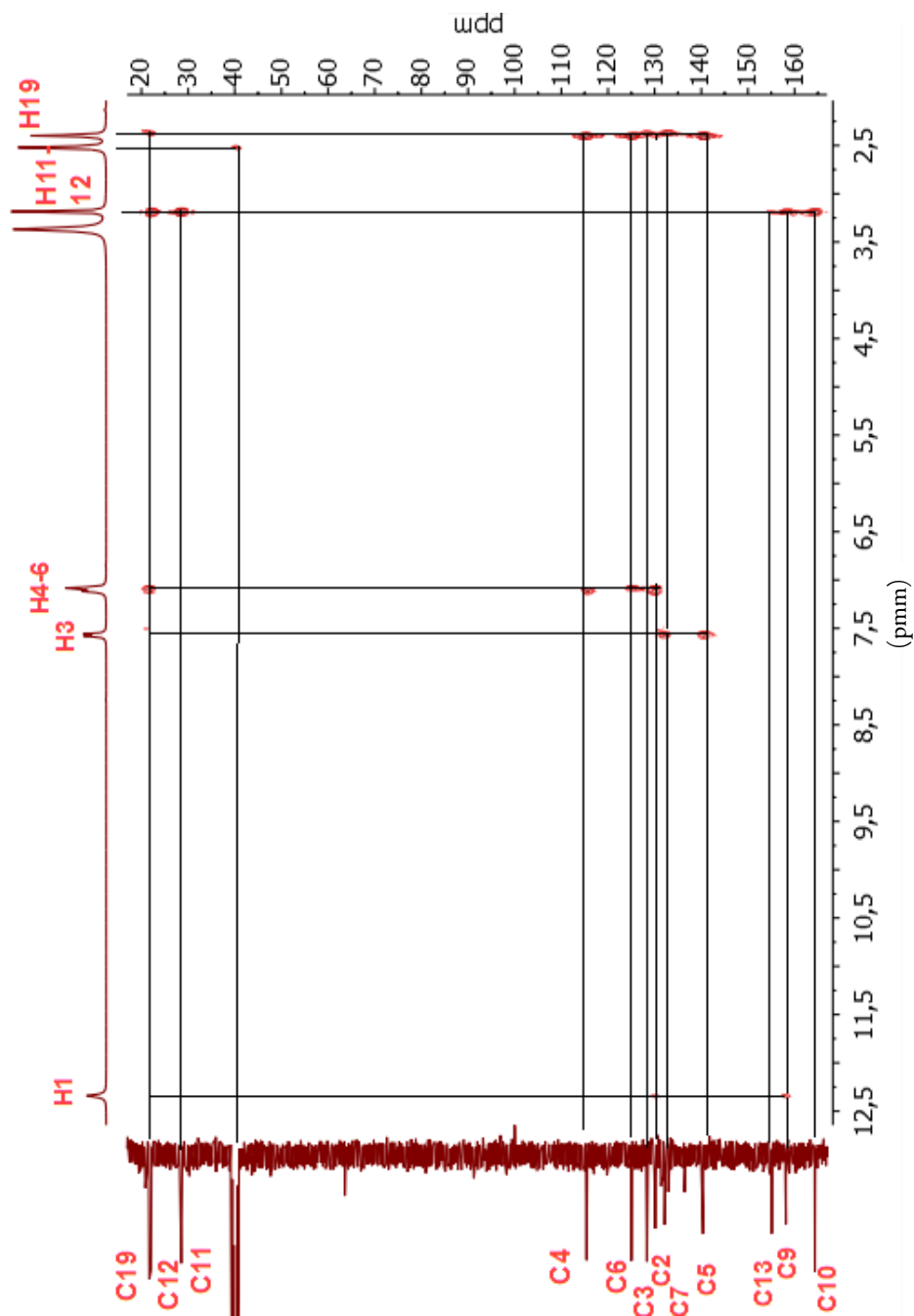


Figura 15. Espectro de HMBC del compuesto (5).

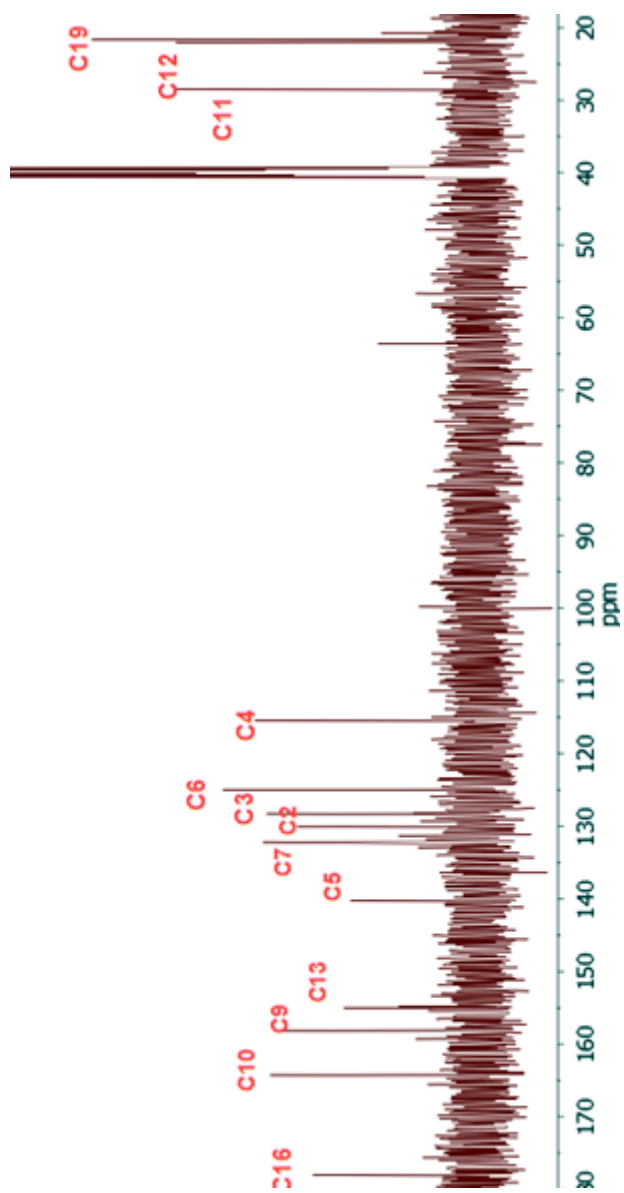


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto (6).

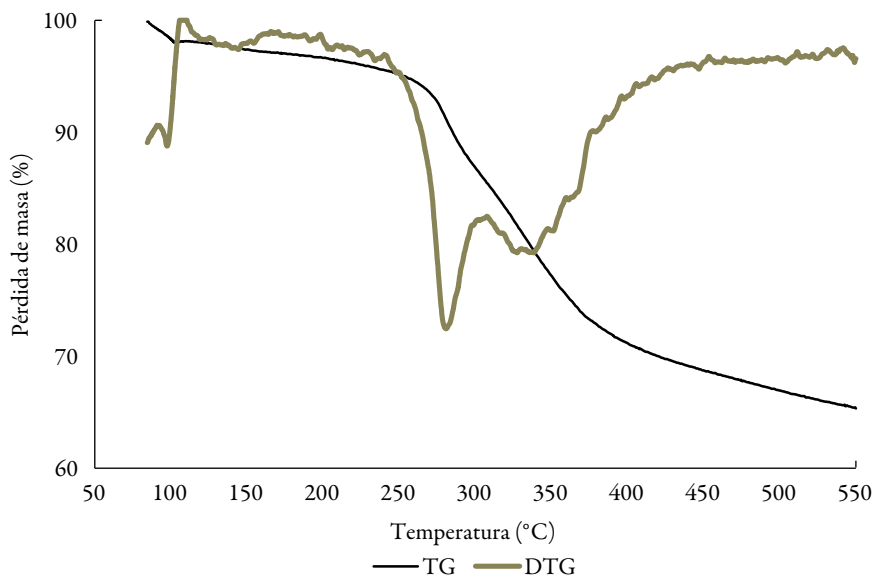


Figura 17. Curva TG-DTG para el complejo de lantano (6).

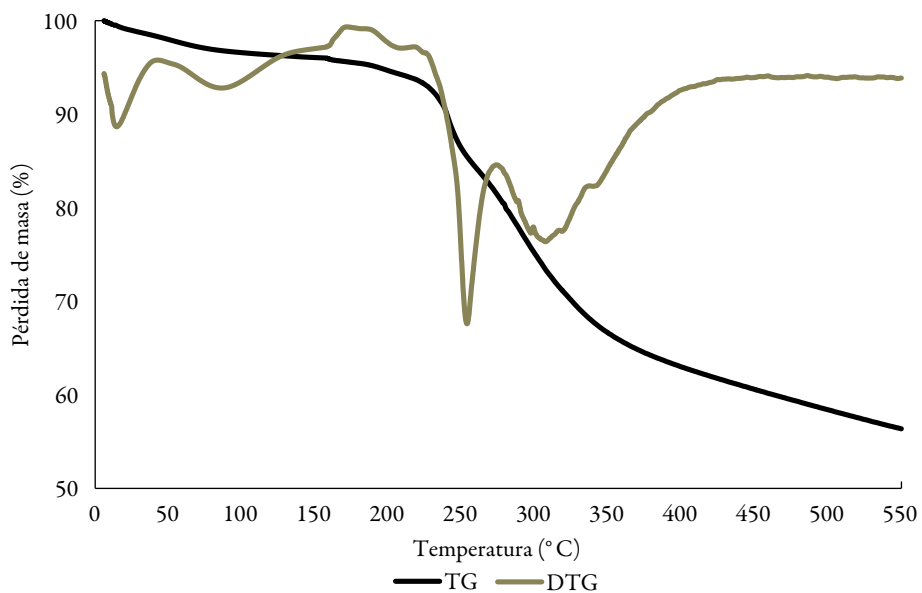


Figura 18. Curva TG-DTG para el complejo de cerio (7).

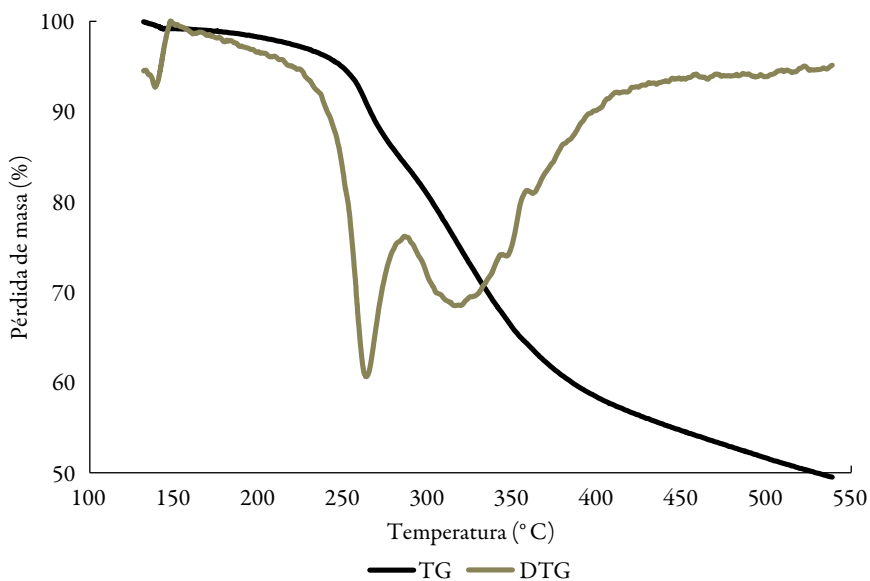


Figura 19. Curva TG-DTG para el complejo de neodimio (8).

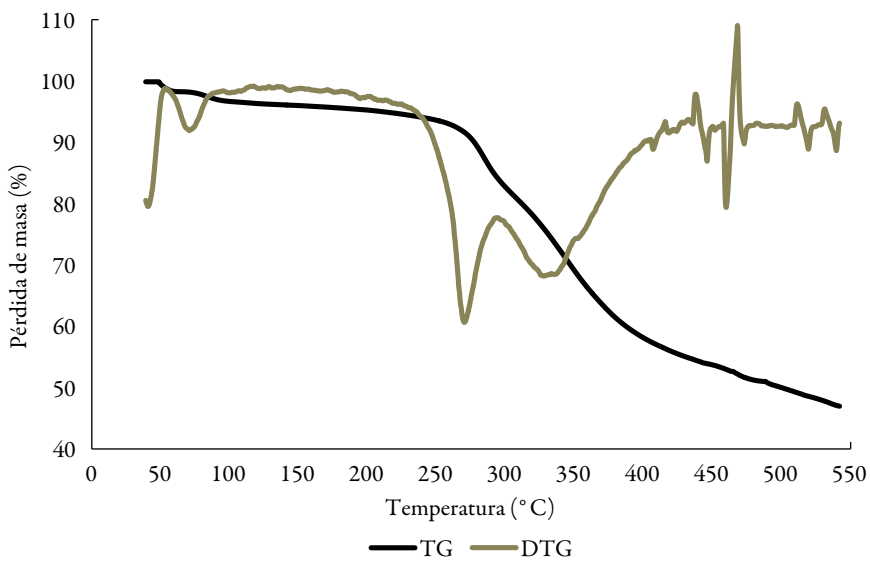


Figura 20. Curva TG-DTG para el complejo de samario (9).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

I.Y. Váquiro-Reyes, A. Aragón-Muriel, D. Polo-Cerón, Síntesis, caracterización y evaluación farmacológica de nuevos complejos metálicos derivados de híbridos heteroaromáticos (benzimidazol/oxadiazol), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 557-588 (2019).

Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos)

Anthony López¹, Katerine Herazo¹, Reinaldo G. Sotomayor*¹

¹Grupo de investigación en control y tecnología farmacéutica, (GITECFAR), Programa de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Carrera 30 N.º 8- 49 Puerto Colombia, Atlántico.

*Correo electrónico: reinaldosotomayor@mail.uniatlantico.edu.co

Recibido para evaluación: 19 de febrero de 2019

Aceptado para publicación: 16 de agosto de 2019

RESUMEN

El ibuprofeno es uno de los fármacos más utilizados e indicado para terapias anti-inflamatorias, dolor, entre otras patologías. Sin embargo, este fármaco presenta una baja y errática biodisponibilidad, debido a la pobre solubilidad acuosa intrínseca del mismo, por lo cual esta categorizado como clase II en el sistema de clasificación biofarmacéutica. El objetivo de este trabajo fue desarrollar, diseñar y evaluar un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable (SEDDS) para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de ibuprofeno.

Aceites, cosolventes, tensioactivos y portadores porosos fueron evaluados por su capacidad de mejorar la solubilidad del ibuprofeno, habilidad de autoemulsificación, robustez en diferentes pH y capacidad de adsorción. El aceite de coco, Tween 80 y propilenglicol lograron un aumento significativo de la solubilidad acuosa del ibuprofeno en un tiempo de autoemulsificación menor a 2 minutos. Neusilin US2[®] fue seleccionado como portador, dando como resultado un pequeño granulo de excelente fluidez, que permitió obtener comprimidos que cumplieron satisfactoriamente las pruebas de control de acuerdo con las especificaciones establecidas. Los SEDDS líquidos y sólidos son una alternativa de formulación ventajosa y prometedora para mejorar la solubilidad de fármacos pobremente solubles de acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutica, a través de sus propiedades de solubilización.

Palabras clave: ibuprofeno, solubilidad, sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables.

SUMMARY

Design and development of a liquids self emulsifying drug delivery system of ibuprofen incorporated by the method adsorption by carriers in solids dosage forms

Ibuprofen is one of the most used drugs and it's indicated for anti-inflammatory therapies and pain, among other pathologies. However, this drug has a low and erratic bioavailability, due to its poor aqueous intrinsic solubility, which is categorized as class II in the Biopharmaceutical Classification System. The objective of this work was to develop, design and evaluate a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) to improve the solubility and dissolution rate of ibuprofen.

Oils, co-solvents, surfactants and carriers were evaluated for their ability to improve the solubility of ibuprofen, self-emulsification ability, robustness at different pH levels and adsorption capacity. Coconut oil, Tween 80 and propylene glycol achieved a significant increase in the aqueous solubility of ibuprofen in a self-emulsification time of less than 2 minutes. Neusilin US2® was selected as carrier, resulting in a small granule of excellent fluidity, which allowed to obtain tablets that satisfactorily fulfilled the control tests according to the established specifications. The liquid and solid SEDDS are an advantageous and promising formulation alternative to improve the solubility of poorly soluble drugs according to the biopharmaceutical classification system, through their solubilization properties.

Key words: Ibuprofen, solubility, self-emulsifying drug delivery system.

INTRODUCCIÓN

La vía de administración oral ha sido la ruta de elección por la mayoría de los formuladores y ha predominado sobre otras vías de administración. Esto se debe a que esta vía es más cómoda para el paciente, segura y económica. Sin embargo, para obtener la máxima seguridad y eficiencia del uso de los medicamentos hay que tener en cuenta aspectos como la biodisponibilidad, la tolerancia gastrointestinal, interacciones y efectos adversos [1].

El mayor problema en las formulaciones de medicamentos administrados por vía oral es la baja y errática biodisponibilidad que presentan los fármacos, la cual resulta principalmente de la pobre solubilidad. Aproximadamente el 40% de los nuevos fármacos desarrollados muestran una pobre solubilidad y presentan un mayor reto para los sistemas de liberación de fármacos modernos ya que no permiten una absorción gastroin-

testinal consistente de una magnitud suficiente para asegurar la eficacia terapéutica [2]. En este sentido, es necesario incluir el ingrediente farmacéutico activo en un sistema de formulación adecuado de tal manera que se pueda modificar su velocidad de disolución y alcanzar el objetivo terapéutico.

Debido a las diferentes características intrínsecas (solubilidad y permeabilidad) que poseen los fármacos, se debe clasificarlos de acuerdo con unos parámetros, tal como lo considera el sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), el cual es un marco científico utilizado para clasificar a los principios activos basándose en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal [3]. Dentro de los fármacos pertenecientes a la clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad) la velocidad de disolución es el factor limitante para su absorción. Por lo tanto, la disolución del fármaco, en el proceso global de su liberación, es el proceso con mayor trascendencia en su posterior absorción y no la rapidez para atravesar las membranas.

En esta clase de fármacos con esta limitante de la velocidad de disolución se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuya utilización en la terapia médica representa un alto consumo a nivel mundial; se estima que en Estados Unidos se prescriben más de 70 000 000 de AINES anualmente y más de 30 billones de dosis son consumidas sin prescripción, 30 000 000 millones de personas consumen diariamente AINES. En 2004, este fue el sexto grupo farmacológico más importante en volumen de ventas. En investigaciones basadas en la actual definición de solubilidad, 15 de los 18 AINES estudiados pertenecen a la clase II, entre ellos el ibuprofeno [4-8].

El ibuprofeno es uno de los fármacos AINES derivados del ácido propiónico más usado en Colombia, aproximadamente por el 70% de los habitantes lo usan. Está indicado en el tratamiento de las condiciones del dolor y los trastornos reumáticos; es un fármaco perteneciente al grupo II del SCB, de carácter lipofílico y tiene un bajo grado de disolución [9].

En los últimos años, se han tomado medidas para desarrollar sistemas de administración de fármacos que tienen baja solubilidad acuosa para mejorar su biodisponibilidad. Entre las diversas estrategias de formulación empleadas se incluyen la formación de sales, la complejación con ciclodextrinas, la micronización, las dispersiones sólidas y las formulaciones basadas en lípidos [10]. Los enfoques de este tipo de formulaciones, particularmente el sistema de entrega de fármacos autoemulsificables SEDDS, los cuales son mezclas de aceites y tensioactivos, idealmente isotrópicos, que a veces incluyen cosolventes para facilitar la disolución del principio activo, y emulsifican bajo condiciones de agitación suave, similar a aquellos que se podrían encontrar en el tracto gastrointestinal [10].

Estos son bien conocidos por su potencial como estrategias alternativas para el suministro de fármacos hidrófobos, que están asociados con baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad oral [9]; es decir, que este tipo de sistemas de liberación de fármacos es adecuado para aquellos principios activos que se encuentran en la clasificación biofarmacéutica de tipo II y IV ya que les permite mejorar su solubilidad permitiendo una alta biodisponibilidad de la misma. El uso de un fármaco perteneciente a estos grupos, como el ibuprofeno, constituye hoy en día un reto para la industria farmacéutica, ya que deben desarrollarse diversas estrategias para disminuir estas limitaciones.

En este trabajo se desarrolló un SEDDS líquido con el objetivo de mejorar la solubilidad del ibuprofeno y su posterior conversión en un SEDDS sólido, siendo caracterizado este sistema en lo concerniente a solubilidad, propiedades de autoemulsificación, robustez y capacidad de carga del SEDDS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para este estudio, el ibuprofeno (IBU) fue donado por Laboratorios Siegfried; el Neusilin US2^(R) donado por Seppic Colombia SAS; los aceites de oliva, coco, canola y soya fueron obtenidos de Alianza Team[®] Colombia; el aceite de maní, de Amerindias Vital Colombia y aceite de ajonjolí (sésamo, de Morenos S.A.S. Tween 80 (Polisorbato 80), Cremophor RH40 (aceite de castor hidrogenado de polioxil 40), propilenglicol, lactosa *spray dried*, estearato de magnesio, povidona K-30, glicolato de almidón sódico y otros materiales de grado reactivo fueron suministrados por el almacén de materias primas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad del Atlántico.

Estudio de solubilidad del ibuprofeno

Los aceites evaluados fueron seleccionados siguiendo diversos criterios, tales como la composición, seguridad y uso común en formulaciones SEDDS tipo III (fase oleosa compuesta de triglicéridos o mezclas de estos, tensioactivos solubles en agua con un valor de HLB > 12 y cosolventes hidrofílicos). Estos son: aceite de oliva, aceite de soya [11, 12], aceite de maní, aceite de coco [13, 14], aceite de ajonjolí (sésamo) y aceite de canola [12, 11]. En esta prueba se empleó el método termodinámico para determinar la solubilidad conocido como matraz agitado (*shake flask*) [15].

Para realizar la prueba de solubilidad de IBU en los aceites se adicionó una cantidad de este en exceso en cada uno de los solventes: se pesó aproximadamente 3,5 g de IBU dentro de tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca y se adicionó 5 g de cada uno de los aceites (oliva, coco, canola, maní, ajonjolí y soya) observándose el exceso en cada

una de las muestras. Estas fueron mezcladas por 3 minutos en un equipo vortex, para facilitar la interacción entre los componentes.

Las muestras preparadas se colocaron en un agitador de vaivén con control de temperatura y agitación (marca Rotaterm) a 200 rpm y a una temperatura constante de 40 °C. Posteriormente fueron tomadas y analizadas cada 2, 6 y 24 horas, hasta verificar que se alcanzara un valor constante de absorbancia en las lecturas, y de esta forma el equilibrio de solubilidad. En los tiempos de muestreo previamente mencionados, los tubos de ensayo fueron llevados a centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos); se tomaron 0,05 mL del sobrenadante y se diluyó hasta 50 mL con metanol 99,8% (grado reactivo, Merck, Alemania). Las muestras se prepararon por triplicado y fueron leídas en un espectrofotómetro UV-Vis referencia T80+(PG INSTRUMENTS) a una longitud de onda 222 nm utilizando metanol como blanco, siendo previamente filtradas a través de filtrojeringa de 0,22 µm [16].

Selección de tensioactivo y cosolvente

Los tensioactivos y cosolvente fueron seleccionados teniendo en cuenta su uso en la industria farmacéutica en formulaciones de SEDDS y su seguridad clínica [17]. Los tensioactivos seleccionados fueron el Tween 80® (polisorbato 80) y Cremophor RH40 (aceite de castor hidrogenado polioxil 40) debido a que poseen un valor de HLB de 15,0 lo cual les confiere características hidrosolubles y solubilizantes [18]. Además, por su parte, el Tween 80 es uno de los más usados debido a que los emulsificantes derivados de fuentes naturales son más seguros que los sintéticos y el cosolvente fue el propilenglicol, ya que este es ampliamente usado como disolvente en formulaciones farmacéuticas parenterales y no parenterales; además, es un componente relativamente no tóxico [19, 20].

Preparación y evaluación del SEDDS líquido

Basados en los estudios de solubilidad en los diferentes aceites y los estudios preliminares de tensioactivos y solventes fueron mezclados el aceite seleccionado, Tween 80 (T80) o Cremophor RH 40 (CP) y propilenglicol (PPG). Para la preparación del SEDDS líquido se utilizó un diseño factorial 2³ (ver tabla 1) en el cual las concentraciones de la fase oleosa, tensioactivo y cosolvente se encuentran en los niveles o porcentajes sugeridos en el sistema de clasificación de formulaciones SEDDS de C.W Pouton [21]. Los factores por su parte estuvieron representados por las sustancias seleccionadas, es decir, aceite, tensioactivo y propilenglicol. La variable de respuesta fue la capacidad autoemulsificadora de cada una de las formulaciones realizadas, en las cuales se evaluaría la formación de una emulsión, microemulsión o nanoemulsión de acuerdo al aspecto formado, es decir, las formulaciones que presentan un aspecto transparente o ligeramente azulado indican la formación de una micro o nanoemulsión [22].

Para evaluar el SEDDS líquido empleando T80 y CP se siguieron las formulaciones descritas en el diseño experimental como se muestra en la tabla 1, evaluándose un total de 16 formulaciones, (F1-F8: Tween80; F9-F16: CP RH40). Se pesaron las cantidades correspondientes a cada una de las formulaciones en un mismo orden de adición: aceite, tensioactivo, cosolvente, ya que está demostrado que dicho orden de adición ayuda a la formación de nano emulsiones [22]. Después se tomó 1 mL de cada una de las formulaciones y se adicionó gota a gota en un beacker que contenía 50 mL de agua (bajo agitación constante) para formar el sistema autoemulsificable. Luego, se evaluó la transparencia de la formulación otorgándole una numeración con rangos de 1 a 10, siendo 1 completamente blanco y 10 completamente transparente.

Tabla 1. Composición y relación en peso para el diseño experimental del SEDDS.

| Ingredientes | Formulación | | | | | | | |
|---------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | F1/F9 | F2/F10 | F3/F11 | F4/F12 | F5/F13 | F6/F14 | F7/F15 | F8/F16 |
| AC | 33,3 | 22,2 | 22,2 | 50,0 | 36,4 | 16,7 | 36,4 | 28,6 |
| T80/CP | 33,3 | 22,2 | 55,6 | 25,0 | 45,4 | 41,2 | 18,2 | 35,7 |
| PPG | 33,3 | 55,6 | 22,2 | 25,0 | 18,2 | 41,2 | 45,4 | 35,7 |

Todos los valores están expresados en porcentajes (% w/w).

AC: aceite de coco; T80: Tween 80; CP: cremophor RH 40; PPG: propilenglicol.

Construcción de los diagramas de fase ternarios

Se construyó un diagrama de fase ternario con los datos obtenidos de la evaluación de la transparencia de cada una de las formulaciones para identificar las proporciones donde se encontraron los sistemas autoemulsificables, sin embargo, la transparencia de estas emulsiones son indicativos de presencia de microemulsiones o nanoemulsiones [22].

Capacidad de carga del sistema

El objetivo de esta prueba fue determinar la cantidad máxima de principio activo que se puede incorporar en el SEDDS y establecer la relación adecuada para evitar que se presente algún tipo de inestabilidad como precipitación y conservar las propiedades autoemulsificables adecuadas. Para realizar la capacidad de carga se preparó aproximadamente 10 gramos de la formulación seleccionada para cada uno de los tensioactivos como se muestra en la tabla 1 y cuyas mezclas se colocaron en agitación constante a una temperatura de 40 °C y se adicionó el principio activo en porciones de 1 g de IBU hasta sobresaturar el sistema, observándose precipitación.

Caracterización del SEDDS líquido

Robustez de la mezcla

Esta fue evaluada como un parámetro de estabilidad que nos indica si la mezcla obtenida sufre cambios a medida que el medio varía. Tomando como referencia otras investigaciones, la robustez del SEDDS se evaluó en 100 mL de 3 medios de disolución a distintos pH (1,2; 4,5; 6,8). [23] Para ello, las muestras se almacenaron durante 2 días en frascos de vidrio sellados herméticamente, protegidos de la luz, a una temperatura de 25 °C, y se reportaron las observaciones obtenidas.

Transformación del SEDDS líquido a sólido

La técnica empleada para lograr dicha transformación fue la adsorción por portador sólido [24]. Se evaluaron dos sustancias con capacidad adsorbente, las cuales fueron aluminometasilicato de magnesio (Neusilin US2®) y lactosa anhidra. Se preparó 25 g de la formulación del SEDDS que había sido seleccionada conteniendo IBU, se le adicionó 25 g del adsorbente a evaluar, manteniendo una relación de 1:1 y se mezclaron los componentes manualmente, tal como fue reportado por Serajuddin *et al.* en 2013 [25].

Caracterización de las propiedades reológicas del polvo

Densidad aparente y compactada

La densidad fue determinada utilizando un voluménometro de asentamiento (*Tap density Tester ZS-2E*). Se pesaron 30 g aproximadamente del polvo y fue colocado en la probeta de 250 mL del equipo completando un volumen total de 82 mL, y fue evaluado de acuerdo al método 1, descrito en la USP para realizar un total de 1250 golpes [26].

Con los datos de densidad se calcularon el índice de Hausner y el índice de Carr. Las ecuaciones involucradas en los diferentes cálculos se presentan a continuación:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{\text{Masa de la muestra (g)}}{\text{Volumen aparente}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Densidad compactada} = \frac{\text{Masa de la muestra (g)}}{\text{Volumen compactado}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Índice de Carr} = \frac{\text{Densidad compactada} - \text{densidad aparente}}{\text{Densidad compactada}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\text{Volumen inicial}}{\text{Volumen compactado}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Robustez del polvo

Como se indicó en la prueba de robustez para el SEDDS líquido, este parámetro se evaluó en 3 medios de disolución a distintos pH (1,2; 4,5; 6,8) [25]. Para ello, las muestras se almacenaron durante 2 días y las observaciones fueron reportadas.

Tamaño de partícula

Para determinar el tamaño de partícula del SEDDS sólido fue empleada la técnica de difracción de luz láser utilizando un Master Sizer 3000. La muestra se preparó en agua en proporción 1:100; se agitó durante 5 minutos y posteriormente se sometió a ultrasonido, obteniéndose un histograma correspondiente [27].

Desarrollo de los comprimidos

Establecidos los componentes del SEDDS líquido conteniendo IBU con su respectivo porcentaje dentro del sistema, se adicionó el portador seleccionado en proporción 1:1 [25]. Para garantizar la dosis deseada de IBU en la mezcla (200 mg) se requería un peso final de la tableta de 1109 mg, a partir de ello se estableció la formulación propuesta para el comprimido: aglutinante *in situ*, polivinilpirrolidona k-30 (5%); desintegrante, glicolato de almidón sódico (2%); lubricante, estearato de magnesio (0,5%); SEDDS cargado con ibuprofeno- portador (92,4%). La compresión del polvo obtenido se realizó utilizando una tableteadora marca Rimek Mini Press-II, empleando un punzón redondo de 11 mm.

Incompatibilidades

Para detectar posibles incompatibilidades o interacciones entre los componentes de la formulación se realizó un análisis térmico utilizando un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo DSC 823). Siete muestras correspondientes a componentes puros y mezclas binarias en proporción 1:1 fueron analizadas: IBU, Neusilin US2®, Neusilin US2®-IBU, SEDDS-Neusilin®, SEDDS-almidón glicolato de sodio, SEDDS-estearato de magnesio y SEDDS-polivinilpirrolidona k-30. Cada una de estas fue colocada en crisoles de aluminio de 40 μ L, sellados y perforados, con un programa de calentamiento desde 50 a 350 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, utilizando una atmosfera inerte de corriente de nitrógeno de 40 mL/min. El equipo fue previamente verificado utilizando un estándar de indio.

Caracterización del comprimido

Análisis de friabilidad y dureza

Para obtener los valores de friabilidad y dureza se utilizó un friabilizador Sotax FT2 y un durómetro Schleuniger Tester 8M. La prueba de friabilidad fue realizada de acuerdo con la USP 37 NF 32 que tiene como límite aceptación una pérdida de peso \leq 1% [26].

Variación de peso

Para determinar este parámetro de control fue utilizado el método descrito por la USP 37 NF 32, analizando 10 unidades, la cuales deben cumplir un criterio $L1\%=15$, si es mayor deben analizarse las siguientes 20 unidades y cumplir con un criterio $L2\%=25$ [26].

Valoración del principio activo en las tabletas

Para realizar la valoración fue preparada una muestra estándar en un matraz volumétrico de 100 mL a partir de un estándar secundario de ibuprofeno 99,8% (BASF, Alemania) pesando 100 mg y completando volumen con buffer fosfato pH 7,2. Para preparar la muestra se tomaron 10 tabletas de ibuprofeno, luego se pesaron y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Del polvo obtenido se tomó una cantidad equivalente a 100 mg de ibuprofeno y se completó el volumen hasta 100 mL con buffer fosfato pH 7,2 en un matraz volumétrico de 100 mL. Fue realizado un barrido espectral en un espectrofotómetro UV-Vis referencia T80+ de la marca PG Instruments y se calculó la cantidad del ingrediente activo en el comprimido [26].

Perfil de disolución

La prueba de disolución se realizó empleando las siguientes condiciones: buffer fosfato pH 7,2; Aparato 2 (paletas, disolutor Agilent 708- DS,) 50 rpm; $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo total de 60 minutos y 4 tiempos de muestreo: 5, 20, 45 y 60 minutos, tomando una muestra de 5 mL en cada tiempo mencionado y filtrándose antes de ser analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis T80+ PG Instruments, debidamente calibrado y verificado para su uso, a una longitud de onda de 222 nm. Esta metodología es resultado de la información disponible en la página del CDER Dissolution Methods para IBU en forma farmacéutica cápsulas para los tiempos de muestreo y las demás condiciones de la prueba son tomadas de la monografía USP de IBU tabletas [26, 28, 29]. El porcentaje de ibuprofeno disuelto de los comprimidos fue calculado utilizando una curva de calibración de 5 niveles para obtener un nivel confianza de 95% y graficado contra cada tiempo de muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de solubilidad

Los datos de concentración presentados en la tabla 2 muestran que la solubilidad más baja se presenta con el aceite de maní y la más alta con el aceite de coco. La mayor solubilidad del IBU hallada en el aceite de coco y oliva coincide con lo reportado por Martin Piest *et al.*, quienes determinaron visualmente que el IBU tienen un rango de

solubilidad entre 17-34 mg/mL en el aceite de soya, ajonjolí y maní [29], y con lo reportado por Cao, *et al.* en 2004, se estableció que la capacidad de los triglicéridos como solvente para fármacos se da principalmente por la concentración de grupos éster en sus estructuras [30]; además, se puede evidenciar cómo la naturaleza del ibuprofeno se relaciona con la de los ácidos grasos (caprílico y capríco) presentes en el aceite de coco lo cual justifica la solubilidad del IBU en este aceite utilizado como solvente. Adicionalmente, es importante señalar que el aceite de coco al estar formado por triglicéridos de cadena media tiene mayor capacidad solvente que aquellos formados por triglicéridos de cadena corta y larga y, adicional a esto, es menos propenso a la oxidación [30].

Tabla 2. Datos de solubilidad de ibuprofeno en los diferentes aceites utilizados como solventes.

| Aceites | [mg/mL]/2 horas | [mg/mL]/6 horas | [mg/ mL]/24 horas |
|----------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Oliva | 27,41 | 28,80 | 29,66 |
| Coco | 27,23 | 32,84 | 37,63 |
| Soya | 17,56 | 25,36 | 28,12 |
| Maní | 22,18 | 22,93 | 26,55 |
| Ajonjolí | 8,58 | 24,71 | 26,91 |
| Canola | 13,74 | 26,99 | 27,43 |

Los datos de solubilidad del IBU en diferentes aceites, hallados en esta investigación, son similares a los reportados por otros autores. Watkinson *et al.*, quienes demostraron que usando un 100% de aceites minerales como vehículo se obtiene una solubilidad expresada en mg/mL de $31,99 \pm 3,44$ [31]. Otros estudios realizados muestran datos de solubilidad del aceite de oliva correspondientes a 3,689 %W/V y al aceite de soya con una solubilidad de 17 mg/mL [32, 33].

Selección de tensioactivo y cosolvente

De acuerdo con los resultados anteriores se pudo determinar que en el aceite de coco se presenta la mayor solubilidad del IBU. Sin embargo, uno de los principales problemas de este aceite es que forma una deposición de cera a baja temperatura la cual depende de la cantidad de triglicéridos de los ácidos grasos principalmente láuricos (saturados) [34]. Pero, se ha demostrado que la adición de tensioactivos puede disminuir la formación de cera y permitir la medida de la viscosidad del mismo; Cremophor y Tween 80 respectivamente fueron los que mejor actuaron sobre el aceite reduciendo la formación de cera a bajas temperaturas [35], razón por la cual estos fueron seleccionados como tensioactivos en esta investigación.

Capacidad de autoemulsificación

El aceite de coco fue seleccionado para la fase oleosa, propilenglicol como cosolvente y para determinar cuál sería el tensioactivo para complementar el SEDDS, se evaluaron los resultados obtenidos y con ellos se construyeron diagramas de fase ternarios para identificar las zonas de autoemulsificación. Las regiones autoemulsificables son regiones claramente isotrópicas, las cuales pueden ser identificadas por observación visual y ayudan a seleccionar las relaciones o radios más adecuados para el desarrollo de formulaciones *SNEDDS*, que aseguren la espontaneidad de la formación de una nanoemulsión dentro las condiciones del tracto gastrointestinal [36]. De las formulaciones del F1-F8, correspondientes a T80 como tensioactivo, a la fórmula F6 (20% AC; 40% T80; 40% PPG) le fue otorgada un valor de 10, indicando una apariencia completamente transparente y homogénea, dándose la autoemulsificación de forma casi inmediata. En el caso de CP, la fórmula F14 (20% AC; 40 % CP; 40% PPG) coincidió en los porcentajes de los componentes y características de la fórmula F6.

En la figura 1 se puede identificar las proporciones donde se encontraron los sistemas autoemulsificables, la transparencia de estas emulsiones son indicativos de presencia de microemulsiones o nanoemulsiones [22]. Empleando T80 como tensioactivo se identificó el área de máxima transparencia: estas concentraciones se clasifican como formulaciones lipídicas tipo IIIB de acuerdo con Colin W. Pouton en proporciones de 41-52%, mismas proporciones para el PPG, además se observó la tendencia a formar emulsiones transparentes a medida que la concentración del aceite de coco disminuye. Las regiones autoemulsificadoras de color rojo representan formulaciones tipo IIIB.

En la figura 2, correspondiente a CP como tensioactivo, se encontró una región de formación de emulsiones transparentes más amplias, así como regiones de formación de emulsiones mucho más opacas que con T80. Con estas pruebas se logró corroborar lo estipulado por Colin W. Pouton donde refiere que las formulaciones lipídicas IIIB son las responsables de la transparencia de la emulsión [37].

Selección de la formulación

De acuerdo a la información obtenida de las formulaciones elaboradas, las pruebas visuales confirman lo mencionado previamente en la bibliografía consultada (formación de microemulsiones y nanoemulsiones en formulaciones de tipo IIIB) [21]. Con ello se seleccionó la formulación F6 y F14 con ambos tensioactivos para seguir evaluando otros aspectos para seleccionar aquella que fuera más apropiada para una formulación final.

Capacidad de carga del sistema

En esta prueba se pudo determinar que la relación existente entre el sistema autoemulsificable conteniendo T80-IBU, capaz de mantener en solución el principio activo

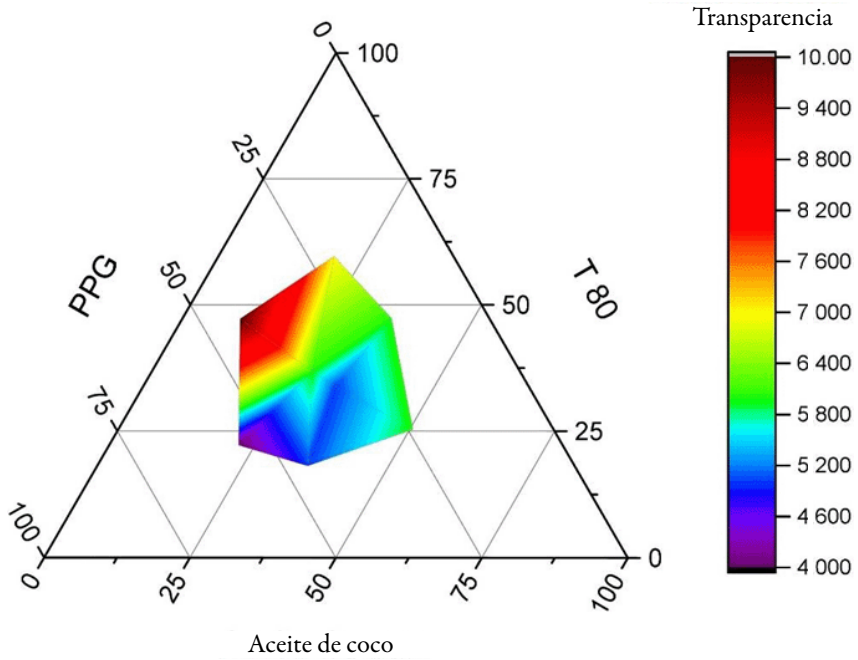


Figura 1. Diagrama ternario de autoemulsificación con Tween 80*.

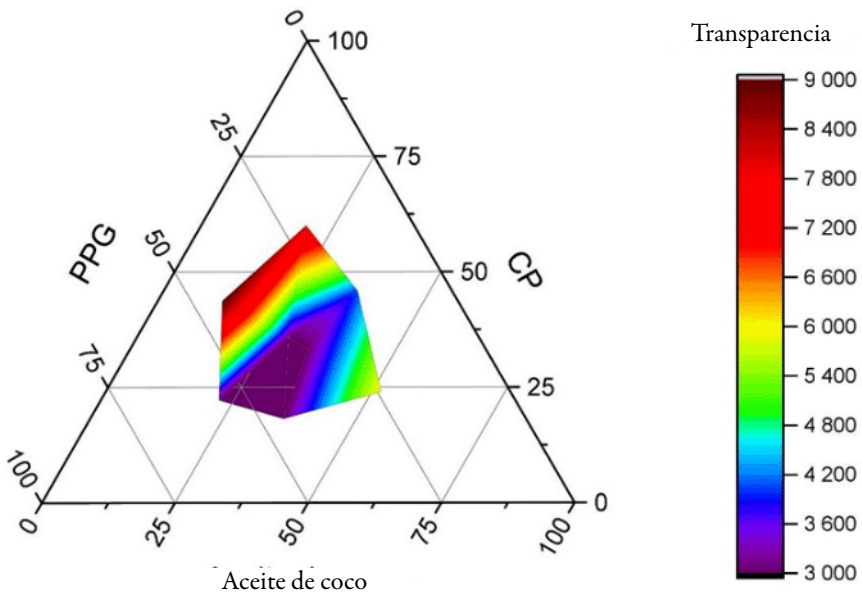


Figura 2. Diagrama ternario de autoemulsificación con CP.

corresponde a 1:0,8, dado que, a partir de la novena adición, se observó un precipitado, indicando la sobresaturación de la mezcla. Para el sistema autoemulsificable conteniendo CP-IBU la relación obtenida fue de 1:1,5, respectivamente, indicando una mayor capacidad de carga.

Caracterización del SEDDS líquido

Robustez de la mezcla a la dilución

La robustez a la dilución evalúa la estabilidad de la dispersión sometiéndola al efecto de diversas diluciones que asemejan las condiciones gastrointestinales *in vivo* con el objetivo de examinar algún cambio físico como coalescencia, precipitación o separación de fases [38, 39]. Los resultados de esta prueba fueron más favorables para la mezcla con T80 como tensioactivo, que con CP y más favorable en términos generales para un pH alcalino (6,8), que para un pH ácido (1,2). En la muestra con CP antes de las 24 horas, en el pH 1,2 se observó un precipitado en gran cantidad y a pH 4,5, algunas partículas en el seno de la solución; este comportamiento puede ser atribuido a la sustancial separación de los tensioactivos hidrofílicos de la fase oleosa después de la dispersión de la formulación en la fase acuosa, reduciendo la solubilidad total de la formulación para el fármaco.

En el buffer fosfato (pH 6,8), después de la dilución no se presentó precipitación, que puede ser atribuible a la alta solubilidad del IBU en este medio comparado con los medios anteriores. Sin embargo, después de las 24 horas de observación, se evidenció la presencia de una cantidad considerable de precipitado en el fondo del beaker. Este evento podría estar relacionado con que el fármaco permanece en un estado supersaturado hasta por 24 horas después del evento inicial de emulsificación [38]. Esto nos llevaría a asumir que la precipitación del fármaco en el intestino antes de la respectiva absorción no se presentaría [37]. En esta prueba de robustez con T80 en los tres medios, el comportamiento antes de las 24 horas fue una solución translúcida, indicando un mejor desempeño de este tensioactivo para la solubilización del IBU en diferentes condiciones similares a las que se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal.

Después de las 24 horas de observación, en el pH 1,2 se observa un ligero sedimento de partículas de pequeño tamaño. A pH 4,5, la mezcla adquiere un color ligeramente blanquecino indicando posiblemente pérdida de solubilidad en este sistema. Para el buffer fosfato pH 6,8 la mezcla se mantuvo inalterada, sin la presencia de precipitado cambio en la transparencia o coloración de la solución. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de capacidad de carga y robustez de la mezcla en la dilución, se decidió seleccionar la formulación con T80, dado que presentó mejores características en los diferentes medios de disolución.

Transformación del SEDDS líquido a sólido

En esta etapa se pudo evidenciar la alta capacidad de Neuslin US2, como portador, dado que se obtuvo un polvo con alta fluidez, de apariencia seca, partículas libres, sin presencia de aglomerado, manteniendo la relación 1:1 propuesta por Gumaste *et al.* en 2013 [25]. Para el caso de lactosa *spray dried* fue necesario alcanzar una relación de 1:4, para lograr adsorber el SEDDS líquido, sin embargo, se obtuvo un aglomerado húmedo, sin fluidez.

Densidad aparente, compactada, índice de Carr, índice Hausner

Los datos obtenidos con el voluménometro dieron como resultado una densidad aparente de 0,3659 g/mL y densidad apelmazada de 0,3704 g/mL. El índice de Carr nos indica que a mayor sea la diferencia de las densidades, mayor será la tendencia del material a apelmazarse y peor será el flujo. El resultado obtenido de la muestra fue de 1,2149, lo cual indica que el polvo obtenido presenta poca tendencia al apelmazamiento y una capacidad de flujo excelente [26].

El resultado obtenido para el índice de Hausner para este polvo fue de 0,9878. Como norma general, los valores del índice de Hausner superiores a 1,5 son indicativos de una fluidez deficiente. Por otra parte, los materiales poco cohesivos apenas se verán modificada su densidad con el apelmazamiento y el IH se aproximará a 1 [27]. Por consiguiente, podemos establecer que el polvo obtenido presenta una buena fluidez.

Robustez de dilución del polvo

A diferencia de los resultados obtenidos de la robustez realizada en el SEDDS líquido, donde se presentaron variaciones en el comportamiento en los distintos pH, para el sistema SEDDS incluido en el portador, la muestra permanece disuelta en los distintos medios durante el tiempo de observación, sugiriendo que la inclusión del Neusilin US2® permite un mejor desempeño del sistema autoemulsificable. Este comportamiento se puede entender dado que el ibuprofeno es un compuesto de carácter ácido y su disolución depende del pH, y se ha visto que la aplicación de un portador sólido alcalino, como el Neusilin US2®, puede ser útil para mejorar la disolución del activo a valores de pH bajos [40, 41].

Tamaño de gota

El 90% de las gotas analizadas se encuentran en un rango de 4,12 a 56,8 µm. A pesar que no existe un criterio específico para clasificar una micro o nanoemulsión de acuerdo al tamaño de los glóbulos formados, como ya se ha señalado la transparencia de las soluciones obtenidas en las pruebas de estos sistemas son indicativos de un sistema autoemulsificable con medidas micrométricas. De acuerdo a las investigaciones el tamaño de gota encontrado posiblemente corresponda al adsorbente Neusilin US2®, como ha

sido reportado por Serajuddin *et al.* Además, estudios realizados previamente sugieren que regiones de la formulación pueden migrar dentro de las redes porosas del Neusilin US2® [25, 41, 42].

Incompatibilidades por DSC de la formulación de comprimidos

El termograma representado en la figura 3 corresponde a Neusilin US2® el cual exhibe el comportamiento para una sustancia en estado puro. Se puede observar el momento de la transición vítrea la cual indica el cambio inicial en la sustancia sin modificar su estado actual. El punto de fusión determinado por el DSC corresponde a 158,84 °C y es el pico más pronunciado en el termograma. De igual manera, se puede observar otro evento térmico a 264,94 °C el cual puede indicar la formación de otro compuesto o que alguno de los componentes del Neusilin US2® se encuentra en estado oxidativo. En el termograma presentado en la figura 4 correspondiente a la mezcla de Neusilin US2®-IBU en relación 1:1 se puede observar el endoterma de fusión a 72,67 °C característico del IBU en estado puro.

Adicionalmente, algunos autores señalan que existe un tipo de reacción entre el Neusilin® y el IBU cuando se encuentran en estado sólido, lo cual produce un producto en forma de sal denominado ibuprofenato de magnesio Mg (IB)2, el cual se hace más efectivo después de la fusión del fármaco. Sin embargo, este no precipita, sino que se presenta en la mezcla en estado iónico o complejo, es por ello que no se muestra ningún otro pico en el termograma [41].

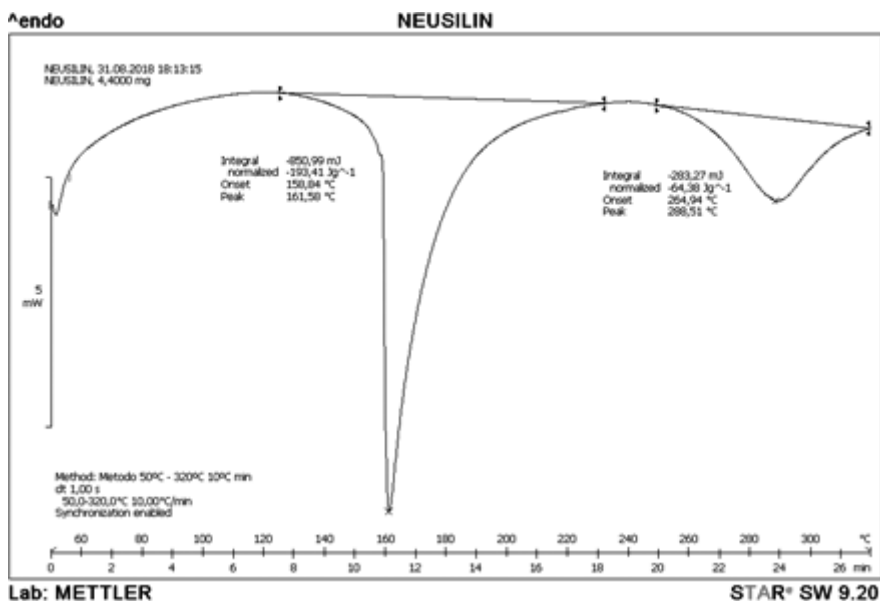


Figura 3. Termograma del análisis térmico por DSC de Neusilin US2®.

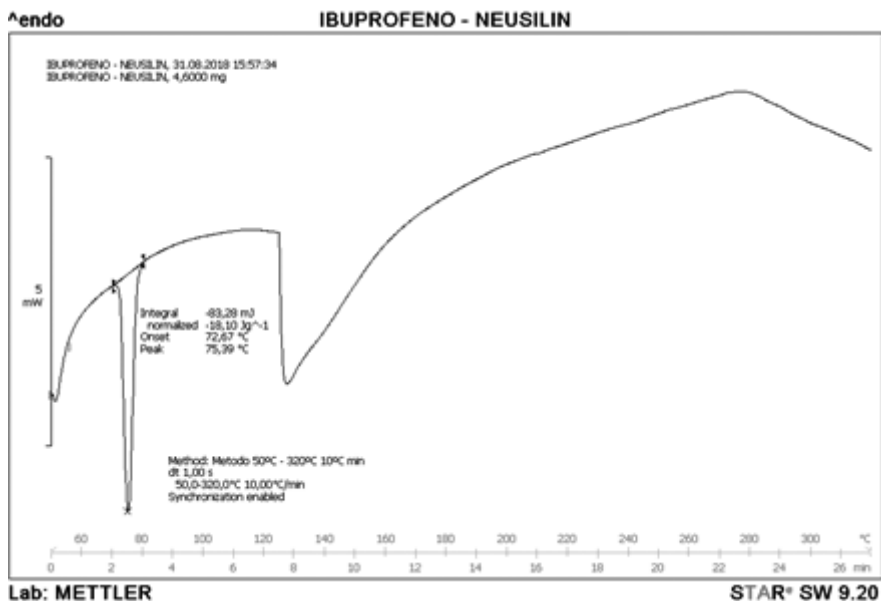


Figura 4. Termograma del análisis térmico por DSC de Neusilin US2[®]-IBU.

La figura 5 corresponde al termograma de mezcla SEDDS-almidón glicolato de sodio 1:1. Este refleja como la mezcla adopta un comportamiento parecido al del Neusilin[®] cuando se analiza de manera individual, es decir, mostrando el endoterma de fusión a 161,22 °C, lo cual nos podría indicar que el glicolato de almidón sódico se encuentra de forma disuelta en el silicato. De igual manera, se puede observar la presencia de un pico no tan pronunciado a 255,50 °C el cual es indicativo del estado oxidativo del almidón presente en la muestra.

En el termograma representado en la figura 6 se puede observar el comportamiento térmico del SEDDS- estearato de magnesio, mostrando un endoterma de fusión a 160,56 °C. Adicional a esto, se ha reportado en la literatura que el estearato de magnesio exhibe muchas formas polimórficas, y dependiendo del origen existen muchas mezclas con ácidos grasos libres, es por ello que en el termograma se puede observar dos picos adicionales que corresponden a impurezas presentes en el estearato de magnesio, estas se pueden atribuir a la presencia de ácido palmítico en el mismo [43].

Los termogramas representados en las figuras 7 y 8 exhiben como las mezclas adoptan el comportamiento del Neusilin[®] cuando se analiza de manera independiente, mostrando un endoterma de fusión cercano a 160 °C. Los resultados en las figuras anteriores indican que probablemente no existe ninguna incompatibilidad en los excipientes empleados para el desarrollo de la formulación del sistema autoemulsificable sólido de IBU.

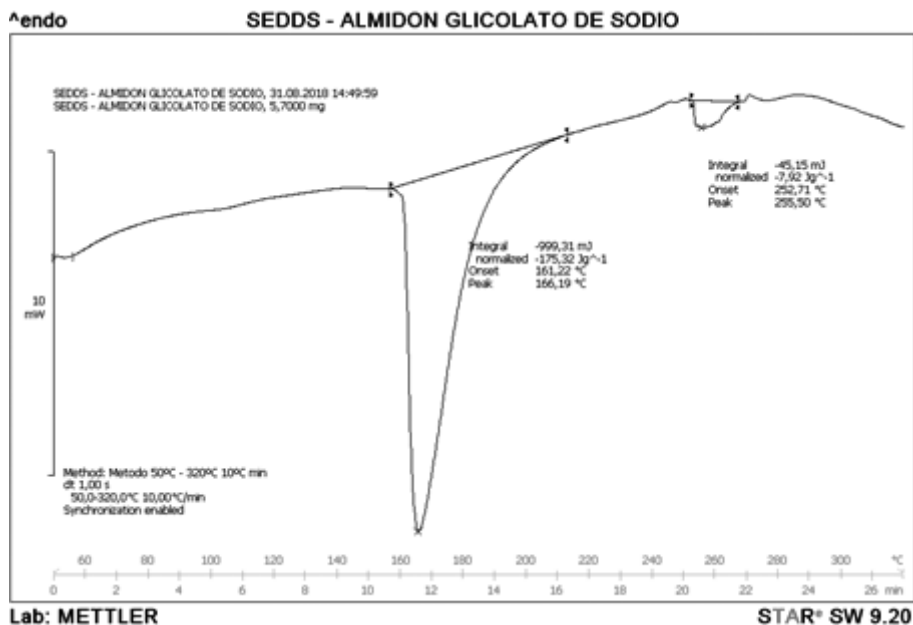


Figura 5. Termograma del análisis térmico por DSC de SEDDS-almidón glicolato de sodio.

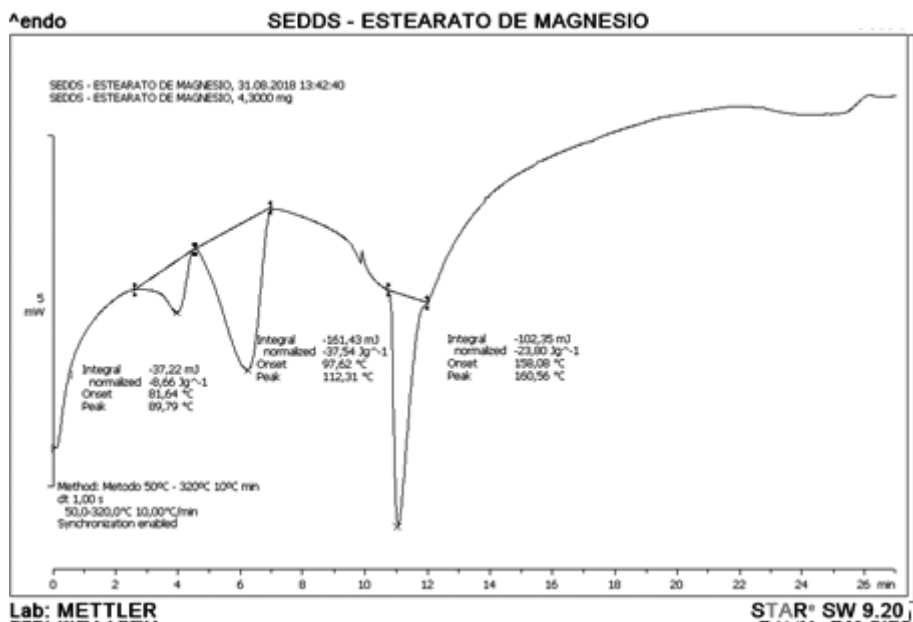


Figura 6. Termograma del análisis térmico por DSC de SEDDS-estearato de magnesio.

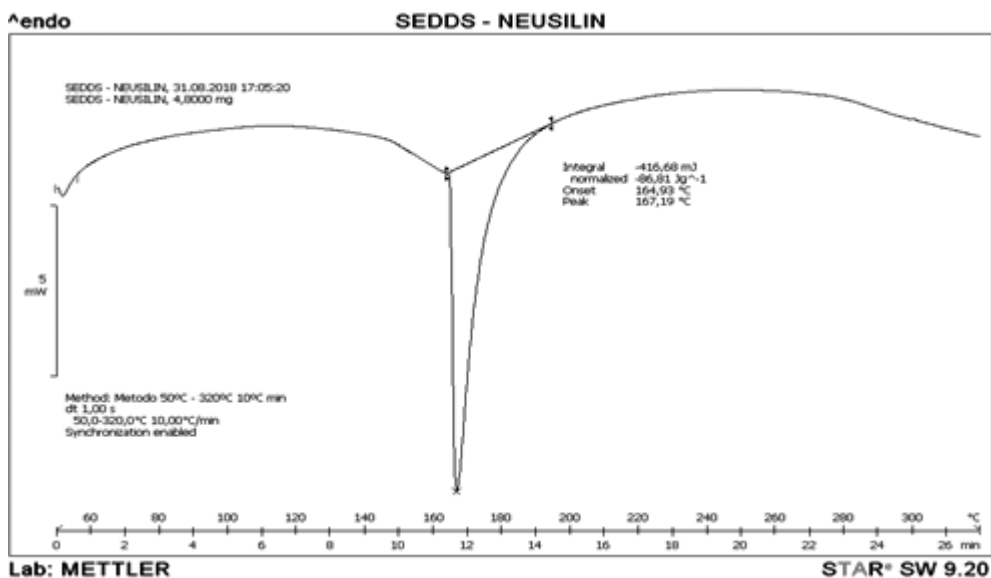


Figura 7. Termograma del análisis térmico por DSC de SEDDS-neusilin US2®.

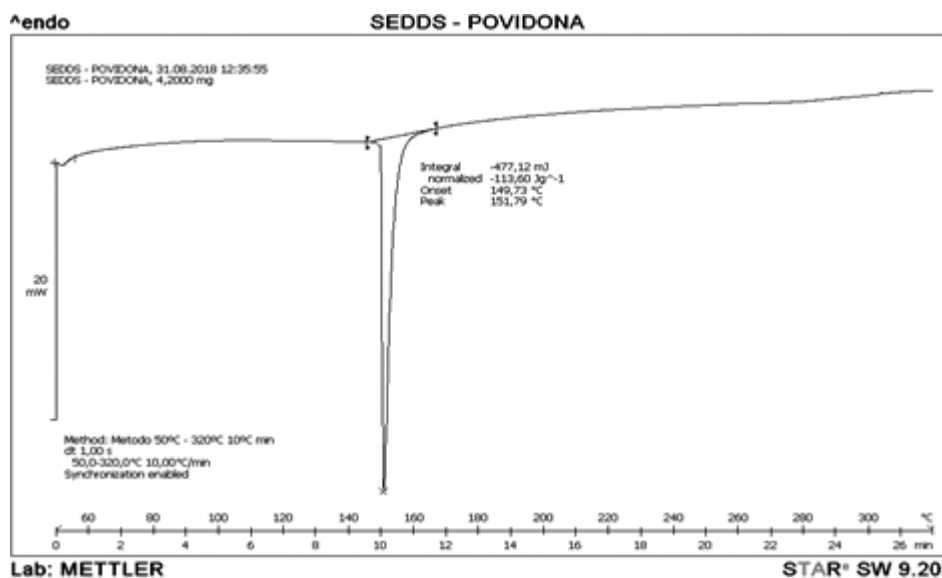


Figura 8. Termograma del análisis térmico por DSC de SEDDS-povidona.

Obtención de comprimidos

Los comprimidos se obtuvieron empleando un punzón redondo 11 mm, debido a que el uso de un punzón más grande ensayado no permitía la salida de las tabletas y

teniendo en cuenta que se ha reportado que las tabletas con Neusilin US2® presentan un ligero desgastamiento en los bordes siendo mayor entre más plana sea la tableta, por tanto, lo ideal es emplear tabletas redondas [44].

Los comprimidos arrojaron un valor de dureza de 19,6 MPa, que se encuentran por fuera del rango reportado y sugerido por Gumaste *et al.*, quienes señalaron que cuando se hace la compresión de tabletas empleando Neusilin US2® y presiones muy bajas (45 a 135 MPa), se da una dispersión del líquido por toda la tableta, dando como resultado una dureza muy baja, este fenómeno de dispersión es posiblemente la causa de que la dureza resultante se encuentre fuera del rango de fuerza de compactación aceptable de 45 a 135 MPa [44].

En cuanto al a valor de friabilidad, se obtuvo un de valor 0,7%: para esta prueba la USP 37 NF 32 tiene como límite aceptación una pérdida de peso $\leq 1\%$, para este caso entonces, los comprimidos cumplen con la prueba de friabilidad. Para efectos de la medición de variación de peso del comprimido, se obtuvo un peso promedio de 353,11 mg, empleando el método descrito por la USP 37 NF 32, para ello se pesaron individualmente 10 tabletas, y el valor obtenido de AV fue de 4,7 cumpliendo con el primer criterio estipulado de $L1\% = 15$ [26].

Valoración de las tabletas

A través del método espectrofotométrico presentado se obtuvo un porcentaje de principio activo de 100,3 %, cumpliendo con las especificaciones señaladas por la USP 37 NF 32: las tabletas de ibuprofeno contienen no menos de 90% y no más de 110% del contenido principio activo [26]. Es importante resaltar que se logró incorporar una cantidad de ibuprofeno de aproximadamente de 64 de 200 mg, que se intentaba incorporar, pero, como ya se ha mencionado, esto se debe a que las características de compresibilidad del polvo obtenido y el líquido incorporado en este, no permitieron obtener un mayor peso de dosificación. Sin embargo, en comparación con otros estudios de tipo con AINES como naproxeno, en el cual solo se incorporaron 6 mg de 250, la cantidad incorporada en nuestra investigación es considerablemente alta [45].

Perfil de disolución

Los resultados del perfil de disolución *in vitro* del comprimido de IBU obtenido se muestran en la figura 9 y la tabla 3. El perfil desarrollado en el pH 7,2 con 4 puntos de muestreo (5, 20, 45, 60 minutos), de acuerdo con la USP 37 NF 32 [27] y con algunas modificaciones en lo relativo a estos tiempos, arrojó como resultado un porcentaje disuelto (Q%) de 93,2 % en 60 minutos, cumpliendo con las especificaciones de $Q\% = 80\%$ y un criterio de aceptación de S1 para las primeras 6 tabletas de Q % de acuerdo

con la USP 37 NF 32. En la tabla 3 y la figura 9 se pueden observar que en los tiempos de muestreo del perfil se logra una liberación gradual, que posiblemente se deba a una formación de la microemulsión.

Tabla 3. Absorbancia y porcentaje de disolución de las muestras en los diferentes puntos.

| T1 (5 min) | | T2 (20 min) | | T3 (45 min) | | T4 (60 min) | |
|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| ABS* | % Disolución | ABS* | % Disolución | ABS* | % Disolución | ABS* | % Disolución |
| 0,0780 | 25,3858 | 0,2570 | 43,2056 | 0,5760 | 74,9626 | 0,7480 | 92,0856 |
| 0,0900 | 26,5804 | 0,2490 | 42,4091 | 0,5160 | 68,9895 | 0,7180 | 89,0990 |
| 0,0920 | 26,7795 | 0,3010 | 47,5858 | 0,6280 | 80,1393 | 0,7900 | 96,2668 |
| 0,0850 | 26,0826 | 0,2570 | 43,2056 | 0,6010 | 77,4514 | 0,7680 | 94,0766 |
| 0,0960 | 27,1777 | 0,2680 | 44,3006 | 0,6010 | 77,4514 | 0,7690 | 94,1762 |
| 0,0890 | 26,4808 | 0,2480 | 42,3096 | 0,5500 | 72,3743 | 0,7250 | 89,7959 |
| 0,0883 | 26,4145 | 0,2633 | 43,8361 | 0,5787 | 75,2281 | 0,7530 | 92,5833 |

| | T1 (5 min) | T2 (20 min) | T3 (45 min) | T4 (60 min) |
|----------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Promedio ABS* | 0,0883 | 0,2633 | 0,5787 | 0,7530 |
| Desviación estándar | 0,0002 | 0,0020 | 0,0082 | 0,0039 |
| Coefficiente de variación | 0,2189 | 0,7448 | 1,4149 | 0,5158 |

*ABS: absorbancia

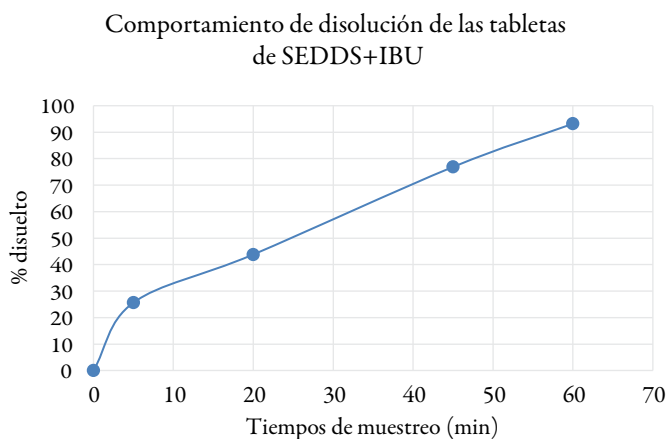


Figura 9. Perfil de disolución *in vitro* de los comprimidos de IBU.

CONCLUSIONES

Los estudios de solubilidad para la correcta selección de la fase oleosa, pruebas con tensioactivos, cosolventes y construcción de diagramas ternarios fueron llevados a cabo conduciendo a una fórmula con adecuadas propiedades autoemulsificables compuesta de aceite de coco, Tween 80 y propilenglicol. Esta combinación demostró poseer una alta robustez en tres medios de disolución a distintos pH (1,2; 4,5; 6,8), siendo más estable después de 2 días en el valor más alto de pH, dado que se encuentra en un sistema supersaturado, asegurando la absorción del fármaco.

Además, se incorporó el SEDDS líquido en una forma de dosificación sólida (comprimidos), a través de la adsorción por portador, se escogió aluminometasilicato de magnesio y se obtuvo un polvo con una capacidad de flujo excelente, el cual se mantuvo disuelto en los medios de disolución de pH evaluados, mostrando que la inclusión del Neusilin US2 permite un mejor desempeño del sistema autoemulsificable, por lo cual se vislumbran como una alternativa prometedora para asegurar la entrega de fármacos poco solubles o con poca permeabilidad [46, 47]. El análisis térmico realizado para cada uno de los componentes de la formulación mostró que no existe alguna incompatibilidad apreciable entre ellos, lo cual garantiza un acierto en la elección de cada uno de los excipientes. Finalmente, los comprimidos obtenidos presentaron características similares a las reportadas en investigaciones previas y los resultados de los ensayos posteriores a la compresión de las tabletas garantizaron el cumplimiento de las especificaciones dictadas por la normativa que se empleó para el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Universidad del Atlántico, a la Facultad de Química y Farmacia, por permitir el uso de equipos y laboratorios para la realización de esta investigación. A Fuji Chemical Industries Co., Ltd. por facilitar el Neusilin US2 para el desarrollo de esta investigación y de igual manera también agradecemos a Laboratorios Procaps SAS por permitirnos el uso del equipo de calorimetría diferencial barrido.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. V. Nekkanti, J. Rueda, Z. Wang, G.V. Betageri, Comparative evaluation of proliposomes and self micro-emulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of nisoldipine, *Int. J. Pharm.*, **505**, 79 (2016).
2. P.P. Constantinides, Lipid microemulsion for improving dissolution and oral absorption: physical and bio pharmaceutical aspects, *Pharm. Res.*, **12**, 56 (1995).
3. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, *Pharm. Res.*, **12**, 413 (1995).
4. K.L. Christensen, G.P. Pedersen, H.G. Kristensen, Technical optimization of redispersible dry emulsions, *Int. J. Pharm.*, **212**, 195 (2001).
5. T.J. Wiegand, C.M. Vernetti, Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) toxicity, Medscape, URL: <http://emedicine.medscape.com/article/816117-overview>, consultado en diciembre de 2016.
6. J.M. Seager, C.J. Hawkey, ABC of the upper gastrointestinal tract: indigestion and non-steroidal anti-inflammatory drugs, *BMJ*, **323**, 1236 (2001).
7. IMS Health Intelligence, 2005, Report N. ° 360, URL: http://www.imshealth.com/vgn/images/portal/CIT_40000873/3/5/81567513i360_final.pdf, consultado en agosto de 2018.
8. Y. Mehran, K. Briggs, C. Jankovski, A. Hawi, The “High Solubility” definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs, *Pharm. Res.*, **21**, 293, (2004).
9. L. Yu, G.L. Amidon, J. Poli, H. Zhao, M. Mehta, Biopharmaceutics Classification System: The scientific basis for biowaiver extensions, *Pharm. Res.*, **19**, 921 (2002).
10. C.W. Pouton, Formulation of self-emulsifying drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 47 (1997).
11. M. Górecki, M. Sosada, B. Pasker, M. Pająk, P. Fraś, Preparation of ibuprofen emulsions with rapeseed phospholipids and vegetable oils, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, **50**, 271 (2016).

12. V. Jannin, J. Musakhanian, D. Marchaud, Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 734 (2008).
13. S. Sharma, H. Bajaj, P. Bhardwaj, A.D. Sharma, R. Singh, Development and characterization of self-emulsifying drug delivery system of a poorly water soluble drug using natural oil, *Acta Pol. Pharm.*, **69**, 713 (2012).
14. S. Anuchatkidjaroen, T. Phaechamud, Injectable surfactant included-virgin coconut oil with and without ibuprofen, *Adv. Mater. Res.*, **581**, 108 (2012).
15. P. Balakrishnan, B.J. Lee, D.H. Oh, J.O. Kim, M.J. Hong, J.P. Jee, J.A. Kim, B.K. Yoo, J.S. Woo, C.S. Yong, H.G. Choi, Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, 539 (2009).
16. M.A. Roni, R.U. Jalil, Comparative study of ibuprofen solubility in synthetic and natural lipid vehicles, *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, **10**, 65 (2011).
17. F.D. Gunstone, *Fatty Acid and Lipid Chemistry*, Springer-Science+ Business Media Dordrecht, Frimley, 1996, Vol 1, p. 205.
18. M. Lozano, D. Cordoba, M. Cordoba, *Manual de tecnología farmacéutica*, Elsevier, Barcelona, 2012, Vol 1, p.155.
19. K.P. Vishesh, Self-emulsifying drug delivery system, *J. Pharm. Res. Opinion*, **3**, 80 (2011).
20. R.C. Rowe, P. Sheskey, M.E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press, Grayslake, 2009, p. 592.
21. C.W. Pouton, Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying, and self-microemulsifying drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 93 (2000).
22. A. Nicolas, T.F. Vandamme, Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences, *Pharm. Res.*, **28**, 978 (2011).
23. K. Balakumar, C.V. Raghavan, N.T. Selvan, S.M. Rahman, Self-emulsifying drug delivery system: Optimization and its prototype for various composition of oils, surfactants and co-surfactants, *J. Pharm. Res.*, **6**, 510 (2013).

24. Y. Ito, T. Kusawake, M. Ishida, R. Tawa, N. Shibata, K. Takada, Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent, *J. Control Release*, **105**, 23 (2005).
25. S. Gumaste, S. Pawlak, D.M. Dalrymple, C.J. Nider, L.D. Trombetta, A.T.M. Serajuddin, Development of Solid SEDDS, IV: Effect of adsorbed lipid and surfactant on tableting properties and Surface Structure of different silicates, *Pharm. Res.*, **30**, 3170 (2013).
26. Farmacopea de los Estados Unidos de América 37/ Formulario Nacional 32 (USP/NF). United States Pharmacopeial Convention. MD, USA: Rockville, 2014, Vol.1, p.374.
27. M. Kazi, H. Al-Qami, F. Alanazi, Development of oral solid self-emulsifying lipid formulations of risperidone with improved *in vitro* dissolution and digestion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **114**, 239 (2017).
28. Dissolution Methods. US. Food & Drug Administration. URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp>, consultado en julio de 2018
29. M. Piest, S. Gupta, A. Bernaerts, Lipid based smedds formulation of ibuprofen and phenylephrine for softgels, URL: <https://biopharma-asia.com/technical-papers/lipid-based-smedds-formulation-ibuprofen-phenylephrine-softgels/>, consultado en abril de 2018.
30. Y. Cao, M. Marra, B.D. Anderson, Predictive relationships for the effects of triglyceride ester concentration and water uptake on solubility and partitioning of small molecules into lipid vehicles, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 2768 (2004).
31. R.M. Watkinson, R.H. Guy, G. Oliveira, J. Hadgraft, M.E. Lane, Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III – Influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **24**, 22 (2011).
32. A. Zaghoul, A. Nada, I. Khattab, Development, characterization and optimization of ibuprofen self-emulsifying drug delivery system applying face centered experimental design, *Int. J. Pharm. & Technol.*, **3**, 1674 (2011).
33. M. Górecki, M. Sosada, B. Pasker, M. Pajak, P. Frasz, Preparation of ibuprofen emulsions with rapeseed phospholipids and vegetable oils, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, **50**, 271, (2016).
34. A. Aiyejina, D.P. Chakrabarti, A. Pilgrim, M.K.S. Sastry, Wax formation in oil pipelines: A critical review, *Int. J. Multiph. Flow*, **37**, 671 (2011).

35. A. Sumuntana, P. Thawatchai, Injectable surfactant included-virgin coconut oil with and without ibuprofen. *Adv. Mat. Res.*, **581**, 108 (2012).
36. K.A. Fotouh, A. Allam, M. El-Badry, A.M. El-Sayer, Development and *in vitro/in vivo* performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems loaded with candesartan cilexetil, *Eur. J. Pharm.*, **109**, 503 (2017).
37. C. Pouton, C.J.H. Porter, Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **60**, 625 (2008).
38. P. Bu, Y. Ji, S. Narayanan, D. Dalrymple, X. Cheng, A.T.M. Serajuddin, Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: polysorbate 80 as the surfactant, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **99**, 350 (2017).
39. T. Tran, S.D.V.S. Siqueira, H. Amenitsch, A. Müllertz, T. Rades, *In vitro* and *in vivo* performance of monoacyl phospholipid-based self-emulsifying drug delivery systems, *J. Control. Release*, **255**, 45 (2017).
40. A. Krupa, S. Jakub, R. Benedykt, J. Renata, Preformulation studies on solid self-emulsifying systems in powder form containing magnesium aluminometasilicate as porous carrier, *AAPS PharmSciTech*, **16**, 3 (2015).
41. A. Krupa, D. Majda, R. Jachowicz, W. Mozgawa, Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin US2, *Thermochim. Acta*, **509**, 12, (2010).
42. H. Williams, M. Van Speybroeck, P. Augustijns, C.J.H. Porter, Lipid-Based Formulations solidified via adsorption onto the mesoporous carrier Neusilin US2: Effect of drug type and formulation composition on *in vitro* pharmaceutical performance, *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1734 (2014).
43. R. Haware, B. Prasad Vinjamuri, A. Sarkar, M. Stefik, Deciphering magnesium stearate thermotropic behavior, *Int. J. Pharm.*, **548**, 314 (2018).
44. S.G. Gumaste, D. Dalrymple, A.T.M. Serajuddin, Development of solid SEDDS, V: Compaction and drug release properties of tablets prepared by adsorbing lipid-based formulations onto Neusilin US2, *Pharm. Res.*, **30**(12), 3186 (2013).
45. K. Čerpnjak, A. Zvonar, F. Vrečer, M. Gašperlin, Development of a solid self-emulsifying drug delivery system (SMEDDS) for solubility enhancement of naproxen, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**, 1548 (2014).

46. A. Bernkop-Schnürch, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS), The splendid comeback of an old technology, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **142**, 1 (2019).
47. A.R. Patel, P.R Vavia, Preparation and *in vivo* evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate, *AAPS J.*, **9**, 344 (2007).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A. López, K. Herazo, R.G. Sotomayor, Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 589-614 (2019).

A prototype of a low-cost eyelid cleaning foaming solution for symptom management in patients with chronic blepharitis: An I-optimal mixture experimental design

Francisco Javier Burgos-Flórez¹, Roxana de las Salas²

¹Department of Mechanical Engineering, Rational use of energy and environment preservation Group (UREMA), Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

²Department of Nursing, Nursing Research Group, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
Dirección: Kilómetro 5 vía Puerto Colombia. Fax: (5) 3598852.

*Correo electrónico: fjburgos@uninorte.edu.co

Received: June 17, 2019

Accepted: September 2, 2019

SUMMARY

Blepharitis is a common chronic eye condition that causes eyelid inflammation, leading to inflamed, irritated, sticky and itchy eyelids and flaking of the skin. For its treatment, patients often need indefinite use of an eyelid cleaning solution which usually cost more than 20 USD per 80 ml bottle and lasts, on average, one month. For those patients unable to afford the treatment, physicians recommend the use of a do it yourself (DIY) solution. However, the efficacy of DIY eyelid solutions might fluctuate according to the type of blepharitis present in the patient and inadequate pH stabilization of the solution might promote additional itchiness, irritation, and dryness of the skin and eyes. Thus, we propose an optimized DIY solution prototype for symptom management in patients with chronic blepharitis. The formulation contains a significant ratio of tea tree oil and resulted in suitable pH and foam expansion values. The low cost and ease of preparation of the designed formulation make it an affordable, effective alternative in the treatment of chronic blepharitis.

Key words: Blepharitis, mixture design, I-optimal, foaming solutions, tea tree oil, sodium lauryl sulfate.

RESUMEN

Un prototipo de solución espumante de bajo costo para la limpieza de párpados y el manejo de síntomas en pacientes con blefaritis crónica: un diseño de mezcla I-óptimo

La blefaritis crónica es una condición ocular que causa inflamación en los párpados, dando como resultado párpados irritados, pegadizos y descamación de la piel. Pacientes con esta condición necesitan usualmente de la aplicación de una solución de limpieza de párpados que cuesta en promedio 20 USD por cada 80 ml de solución y tiene un rendimiento de un mes. Para aquellos pacientes incapaces de costear el tratamiento, los médicos recomiendan el uso de soluciones hazlo tú mismo (DIY en inglés). Sin embargo, la eficacia de estas en el tratamiento de la condición puede fluctuar de acuerdo con el tipo de blefaritis presente. Adicionalmente, una inadecuada estabilización del pH de la solución puede promover una mayor irritación, resequedad y picazón en la piel y en los ojos. Por lo tanto, en este trabajo proponemos un prototipo experimental de solución DIY para el manejo sintomático de pacientes con blefaritis crónica. La formulación contiene una proporción significativa de aceite de árbol de té y posee un pH adecuado y alta producción de espuma para su correcta aplicación en la piel. El bajo costo y facilidad de preparación hacen de ella una alternativa efectiva y asequible en el tratamiento de la blefaritis crónica.

Palabras clave: Blefaritis, diseño de mezcla, diseño I-óptimo, solución espumosa, aceite de árbol de té, lauril sulfato sódico.

INTRODUCTION

Blepharitis is a common chronic eye condition that causes eyelid inflammation, with a prevalence of 8.1% among subjects aged 40 years or older [1]. It mainly affects palpebral margins, specifically the eyelash follicles and the sebaceous glands located near them. Symptoms include inflamed, irritated, sticky and itchy eyelids, flaking of the skin, sensitivity to light and red, watery eyes [2]. Complications of the condition can often lead to permanent alterations to the eyelid margin or vision loss from superficial keratopathy, neovascularization of the cornea and ulceration [3].

Blepharitis has been linked to a wide arrange of conditions. Among them, seborrheic dermatitis, Staphylococcus aureus infection, Rosacea, Meibomian gland dysfunction, and mite infestation have been the most cited [3-6]. However, the exact cause of blepharitis remains to be elucidated, as its emergence could be attributed to multiple skin conditions being simultaneously present.

Blepharitis has been categorized based on the anatomical location of disease: Anterior blepharitis occurring due to a staphylococcal infection and seborrheic dermatitis, which cause inflammation at the base of the eyelashes; Posterior blepharitis due to meibomian gland dysfunction (MGD), a condition characterized by abnormalities and blockage of the meibomian glands, stopping the secretion of enough oil into the tears, which affects the posterior lid margin that comes into contact with the cornea and bulbar conjunctiva; and marginal blepharitis, including both anterior and posterior [3]. On the other hand, high numbers of *Demodex folliculorum*, a mite commonly found on human skin, have been found around the lash follicles and sebaceous glands of patients with blepharitis [7]. This mite might have a role in both anterior and posterior blepharitis since it could block the hair follicles, or induce an inflammatory immune response after its demise [7].

Depending on the location, different treatments have been proposed to control, but not cure, blepharitis. For anterior blepharitis, topical antibiotics such as tobramycin and neomycin, in combination with steroids such as dexamethasone, have provided some symptomatic relief during acute face, and have been effective in clearing bacteria from the eyelid margins [8]. For posterior blepharitis, tear-free baby shampoo has been used for MGD treatment, offering symptom relief in some patients. The use of Baby shampoo has been a common medical practice suggested by physicians to patients, since it allows the cleaning of the eyelids with relative ease [9]. Moreover, supplements rich in omega-3 fatty acids have been shown to improve MGD symptoms [10]. Terpinen-4-ol, a component of Tea tree oil (TTO), has been found useful in treating MGD and promoting bacterial and Demodex eradication [11].

Even though different treatment alternatives exist for all types of blepharitis, no single treatment has been found to be effective in curing the condition. Once the diagnosis has been made, patients are usually placed in a short course of antibiotics in combination with a steroid agent. The condition usually stabilizes for a few weeks till a relapse occurs. Considering the risk of antibiotic resistance and side effects produced by continued steroid use in chronic blepharitis conditions, patients are eventually subjected to a standard indefinite daily cleaning regimen of the eyelids. This treatment relies on warm compresses and the use of eyelid scrubs soaked in a solution of water with baby shampoo for the mechanical removal of debris, scales and the prevention of MG blockage.

Various eyelid cleaning foaming solutions have recently entered the market. These solutions have been marketed as effective treatments for Demodex eradication in the eyelids and optimal control of blepharitis since they commonly contain TTO, which has been demonstrated to possess acaricidal, antibacterial, antipruritic, anti-inflammatory, and wound healing effects [12]. Therefore, in order to control blepharitis, ophthalmologists often prescribe these formulations as adequate eyelid cleaning solutions.

Nevertheless, a standardization of TTO concentration which provides effective treatment of the condition has not been reported and usually isn't defined on the commercial eyelid cleaning solutions. Also, being a chronic condition, blepharitis requires indefinite use of an eyelid cleaning solution which, in the majority of cases, has a minimum price of 20 USD per 80 g bottle and lasts, on average, one month. For those patients unable to afford the treatment, physicians have been recommending the use of a do it yourself (DIY) solution containing Johnson's Baby Shampoo in water or other similar shampoos. This alternative has eventually become the most common way of treating blepharitis and has been recognized by the American Academy of Ophthalmology (AAO) as a viable lid hygiene option [13]. However, the efficacy of DIY eyelid solutions might fluctuate according to the type of blepharitis present in the patient. Moreover, an inadequate pH stabilization of the solution might promote additional itchiness, irritation, and dryness of the skin and eyes [14].

For the above reasons, it is clear that a low cost effective and standardized eyelid cleaning solution for the treatment of chronic blepharitis has not been reported. Thus, this work proposes an optimized DIY solution prototype for symptom management in patients with chronic blepharitis. Through the creation and execution of an I-optimal mixture experimental design, an optimized formulation of water, TTO, baby shampoo and sodium lauryl sulfate (SLS) was found. The aim of the design was to find the proportion of each component in the mixture that allowed an optimal pH, ideally equal to skin pH of 5.0 [14], an optimal capacity to form foam for correct application of the solution on the eyelids and increased TTO penetration [15], and a minimum TTO proportion that resulted in effective eradication of ocular Demodex, bacteria, decrease in inflammation and itchiness and, eventually, a state of remission in the condition. Therefore, pH and foam expansion, defined in equation 1, were the response variables of the experiment. Statistical analysis was performed for determining the statistical validity of the results, and a regression model was determined for each response variable. Through a multiple response optimization algorithm provided by the software Design-Expert version 11 and an overlay contour plot of pH and foam expansion, an optimal point of operation and design region were determined for the design solution.

METHODOLOGY

Materials

Concentrated TTO was purchased from Droguerías Juliao S.A. (Barranquilla, Colombia), 70% (w/v) SLS was purchased from Uniquímicos Ltda. (Barranquilla, Colombia) and Johnson's Baby no more tears Shampoo was purchased from Olímpica S.A. (Barranquilla, Colombia).

Experimental protocol

Thirty grams of solutions were prepared as follows. We placed a 100 ml beaker in an OHAUS AV64C balance and weighted it. 70% (w/v) SLS was added to the beaker using a 10 ml syringe and weighted until desired mass was reached. The balance was tare weighted again, and tap water was added with another 10 ml syringe to the beaker and weighted till desired mass was reached. The mixture was then placed in a magnetic stirrer at 80 °C and 300 rpm for 30 minutes till SLS was solubilized entirely, and was left for 30 minutes for the temperature to decrease to ambient conditions (between 20 °C and 23 °C). The beaker was again placed on the balance which was tare weighted, and Shampoo was added and weighted to the desired mass. The balance was tared weighted, and TTO was added to the desired mass. The mixture was then placed in a magnetic stirrer at 500 rpm in ambient temperature for 10 minutes till the solution was thoroughly mixed.

pH measurements were made using Fisher-Scientific Accumet pH-meter. The device was first calibrated with 4.0, 7.0 and 10.0 pH solutions, provided by the manufacturer, to ensure accurate measurements. Five consecutive pH measurements were performed for each solution, and the mean value was registered. The pH-meter bulb was thoroughly rinsed with tap water before and after each measurement was made.

Foam expansion was measured after pH measurements were made. 10 ml of each freshly prepared solution were added to a 100 ml graduated cylinder using a 10 ml pipette previously rinsed with tap water. A glass stopper was inserted on top of the cylinder. The solution was vertically shaken as vigorously as possible for 10 seconds while holding the stopper with one finger. As soon as shaking was finished, the total volume of foam was noted. Three consecutive measurements were made for each solution, and a mean foam volume was recorded. Foam expansion was calculated using equation 1.

$$\text{Foam Expansion} = \frac{\text{Volume of foam}}{\text{Volume of solution}} \quad (1)$$

Design of experiment (DoE)

The purpose of this work was to find an optimal operating condition in which the solution pH was maintained as close as healthy skin pH, which has been reported as being less than or equal to 5.0 [14]. Besides, in order to maximize Demodex and bacterial eradication and symptom relief in patients with blepharitis, TTO proportion had to be maximized without incurring in a deficient ability to form foam and an increased risk of skin irritation. Therefore, four design factors were selected as ingredients of the solution: Water (A), TTO (B), Baby Shampoo (C) and SLS (D) and two response

variables were defined: pH and Foam expansion. According to Myers *et al.* [16], when the design factors are ingredients or components of a mixture and their proportions are dependent on one another, the appropriate design is a mixture design. In this type of design, the response variables are a function of the proportions of each ingredient and not of the total amount of each ingredient in the mixture. Mixture designs are special cases of response surface designs, being prediction and optimization the main goals of most mixture experiments [17].

In this work, 30 grams solutions were prepared. The sum of the masses in grams of the four factors had to be equal to the former amount. All experimental runs were carried out in lab conditions by the same operator. Ambient temperature varied between 20 °C and 23 °C but wasn't measured during each experimental run. Hence, it was considered a non-controllable nuisance factor. Similarly, relative humidity was not measured and was considered a non-controllable nuisance factor.

While the common mixture experiments allow the construction of lattice designs which permits the exploration of the entire simplex region, the nature of some experiments restrict it by putting multiple constraints on the component proportions [18]. Quite often, one is faced with upper and lower bounds for every component. These constraints are usually determined by reasonable bounds on the relative proportion of components that produce useable results [16]. Such was the case of the mixture design proposed in this document. Table 1 shows the constraints placed for each component of the mixture formulation. The sum of the proportions of the components in each formulation had to be equal to 1.

Table 1. Component proportion constraints for the defined mixture formulation.

| Lower bound (Li) | | Component | | Upper bound (Ui) |
|------------------|---|-------------------|---|------------------|
| 0.600 | ≤ | A: water | ≤ | 0.750 |
| 0.010 | ≤ | B: TTO | ≤ | 0.100 |
| 0.050 | ≤ | C: shampoo | ≤ | 0.200 |
| 0.010 | ≤ | D: SLS | ≤ | 0.120 |
| | | A+B+C+D | = | 1.000 |

TTO: tea tree oil; SLS: sodium lauryl sulfate.

TTO ratio was defined based on previous experiments which showed that higher ratios increased solution viscosity and required higher surfactant proportion for emulsion formation and foam production. In addition, previous studies have reported notable skin irritation following application of 50% TTO lid scrubs for ocular Demodex

eradication [11, 19]. TTO contact allergy has also been reported in patch tests with as little as 5% oxidized TTO [20]. Lee *et al.* [21] have suggested that TTO should be used at less than 10% for acne treatment to prevent skin irritation. For these reasons, the proportion of TTO was left between 1% and 10% of total solution mass.

Previous studies showed that baby shampoo could be used for skin pH stabilization, emulsion and foam formation, increasing wetting ability and detergent properties, surface tension reduction and skin protection due to its pH buffering capabilities and other skin care components [22-24]. However, previous experiments showed that a ratio of more than 20% induced higher solution viscosity and did not account for a significant variation in pH or higher foam production. Therefore, shampoo proportion was maintained between 5 and 20%.

SLS proportion was established based on previous studies which defined concentrations of less than 10 % to be an ideal point between foam production and the risk of skin irritation [15]. In addition, various studies have shown that the application of solutions containing 0.5%-10% SLS cause slight to moderate irritation and those with 10% - 30% caused skin corrosion and severe irritation [25, 26]. SLS induced skin irritation is caused by its capability to reduce surface tension. However, its ability for altering the stratum corneum, the outermost layer of the epidermis, makes it useful to enhance penetration of other substances in patch tests and animal assays [27]. For these reasons, a range between 0.1% and 12% was found adequate for improving foam formation and TTO penetration and not massively increasing the risk of skin irritation and dryness.

Tap water was found to be needed in at least a 60% proportion of the mixture formulation for ensuring adequate solubility of components, emulsion formation, and foam production. The higher bound of 75% was defined considering the proportion of the other components, which had to be present in at least their lower bound in every solution.

To check the consistency of each constraint and see if every upper and lower bound was attainable, a defined number of inequalities needed to be satisfied [18]. Equation 2 shows the conditions that were evaluated for the definition of adequate bounds.

$$R_i' = \frac{R_i}{1 - \sum_{i=1}^q L_i} \leq 1 \quad (2a)$$

$$R_i \leq 1 - \sum_{i=1}^q L_i \quad (2b)$$

$$U_i + \sum_{j \neq i}^q L_j \leq 1 \quad (2c)$$

$$L_i + \sum_{j \neq i}^q U_j \geq 1 \quad (2d)$$

$$\sum_{j \neq i}^q R_j \geq 1 \quad (2e)$$

Table 2 shows the result for the left side of each inequality of equation 2 using the specified component constraints. Since all the inequalities were met, every component constraint was attainable.

Table 2. Consistency checking of upper and lower bound constraints.

| Component | Li | Ui | Ri | 2a | 2b(≤ 0.33) | 2c | 2d | 2e |
|-----------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|
| Water | 0.6 | 0.75 | 0.15 | 0.45 | 0.15 | 0.82 | 1.02 | 1.06 |
| TTO | 0.01 | 0.1 | 0.09 | 0.27 | 0.09 | 0.76 | 1.08 | 1.24 |
| Shampoo | 0.05 | 0.2 | 0.15 | 0.45 | 0.15 | 0.82 | 1.02 | 1.06 |
| SLS | 0.01 | 0.12 | 0.11 | 0.33 | 0.11 | 0.78 | 1.06 | 1.18 |

TTO: tea tree oil; SLS: sodium lauryl sulfate.

Two response variables were evaluated for each mixture: pH of the solution and foam expansion. Both were measured following the experimental protocol defined in section 2.2. Foam expansion was obtained using equation 1.

As the defined components have both lower and upper constraints (see table 1), the feasible mixture region was not a simplex. Therefore, standard simplex-type mixture designs could not be used. As stated by Myers *et al.* [16], when both upper and lower bound constraints are present in a mixture experiment, the feasible design space is an irregular hyper polytope, and a computer-generated design should be used in the experiment. They suggested that either an I-optimal or a D-optimal design is appropriate, but also noted that an extreme vertices design could be used in such situations. Nevertheless, an adequate I-optimal or D-optimal design is superior to the extreme vertices design when comparing prediction variance performance using the fraction of the design space plot (FDS) [16].

In this work, an I-optimal design was created using the software Design-Expert version 11. I-optimality criteria was favored over D-optimality for the following reasons: The I-optimal algorithm chooses runs that minimize the average scaled prediction variance across the region of experimentation, while the D-optimal algorithm chooses runs that maximize the determinant of the information matrix ($X'X$), and, in doing so, minimize the volume of the confidence ellipsoid about the unknown model parameters [17]. I-optimal criteria are desirable for response surface method designs (RSM) when the goal is to optimize prediction capability, requiring greater precision in the estimated model. In contrast, the D-optimal criteria are recommended to build factorial designs where the goal is to find factors relevant to the process. Hence, if good prediction in the design region is the primary goal of the experiment, then I-optimal designs generally have better overall performance [16]. The decision of not doing an initial mixture screening design relied upon the fact that only four design factors were deemed significant in the response variables analyzed. Furthermore, there were no constraints in time and resources, since the defined components, their ranges and associated costs and lab access permitted the execution of an experiment aimed at optimization and prediction.

The I-optimal RSM mixture design chosen for this work was defined based on the criteria established by Myers *et al.* [16] for selecting a RSM design. Among the recommendations, if resources permit, one must always choose the highest degree order model and run between 8 to 10 additional runs. If the experimenter designs the experiment without some additional points and the chosen model is inadequate, then a problem arises. Half of these additional runs should be replicates of some points in the design and the other chosen as new distinct points so that the lack of fit of the model can be investigated.

The design chosen was fitted to a special cubic model requiring 14 model points, with five replicate points, five lack of fit points and one additional model point, giving a total of 25 experimental runs which were randomly executed. Equation 3 shows the Scheffé special cubic mixture model used in the mixture experiment.

$$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{q-1} \sum_{j=i+1}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^{q-2} \sum_{j=i+1}^{q-1} \sum_{k=j+1}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (3)$$

Where q is equal to the number of components in the mixture (four in this case). This design allowed the sequential construction of models of increasing order (linear, quadratic and special cubic) for adequate model fitting and was cost-effective, considering the initial assumptions regarding experimental costs. In addition, it provided good model parameter estimates, an estimate of the pure experimental error and gave sufficient information for making a lack of fit test.

The computer-generated I-optimal design was chosen based on comparing the values of three optimality criteria for different I-optimal designs: Average variance mean, G efficiency and I value. Average prediction variance and I value are measures of I-optimality. I value is particularly useful in comparing I-optimality of designs with an equal number of runs. Thus, lower values of both indicate a better ability to minimize the integral of the prediction variance across the factor space and better optimization of the factor settings [16]. G efficiency seeks to minimize the maximum predicted variance across the entire design space and, particularly, at the edges of it. Hence, a high G-efficiency means that the design is protected against the worst-case prediction variance, allowing it to predict new response values anywhere in the design region with a minimized maximum standard error [16]. For these reasons, to increase design optimality, average variance and I value needed to be minimized, and G efficiency needed to be maximized.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done in the software Design-Expert version 11. Initially, a type I sequential model sum of squares was performed together with a lack of fit test to determine the highest order polynomial that adequately fitted each response variable. Afterward, an analysis of variance (ANOVA) was performed for each response variable, where non-significant factors were excluded from it. We graphically and analytically assessed the assumptions of normality, homoscedasticity, and independence of residuals to establish statistical validity. All statistical tests were considered significant with a p-value lower than 0.05. Contour plots were also created to analyze response behavior along the region of experimentation.

A regression model was obtained for each response variable. Model suitability was established considering global model significance, coefficients significance and analysis of the structure of residuals. Multiple response optimization was carried out using the regression models obtained for each response variable. From it, an optimal point of operation for the formulation was found, and a design region was determined. Optimization criteria consisted of maintaining a mixture pH lower than to 5.2 and higher than 4.8 while maximizing TTO proportion and maintaining a value of foam expansion higher than 1.9.

RESULTS AND DISCUSSION

Choice of I-optimal design

Table 3 shows the results after changing parameters of both coordinate and point exchange search algorithms in Design-Expert version 11 to generate different I-optimal designs. Design number 3 was chosen among the six designs created since it showed the lowest values in average prediction variance and I value, and the highest G efficiency.

Table 3. Comparison of different optimality criteria for six I-optimal designs.

| Design | Search algorithm | Average variance | G efficiency | I |
|--------|----------------------------|------------------|--------------|---------------|
| (1) | Coordinate exchange | 0.3165 | 43.7 | 0.3171 |
| (2) | Coordinate exchange | 0.3449 | 27.01 | 0.3455 |
| (3) | Coordinate exchange | 0.3058 | 46.13 | 0.3074 |
| (4) | Point exchange | 0.3276 | 45.73 | 0.3256 |
| (5) | Point exchange | 0.3294 | 42.11 | 0.3293 |
| (6) | Point exchange | 0.3277 | 25.77 | 0.3256 |

Design of experiment (DoE)

Table 4 shows the results obtained for pH and Foam expansion on each experimental run. Table 5 shows the mass amounts of each mixture component for obtaining 30 g solutions.

Table 4. I-optimal design results.

| Run | Components | | | | | Response variables | |
|-----|------------|--------|------------|--------|-------|--------------------|----------------|
| | A: water | B: TTO | C: shampoo | D: SLS | Total | pH | Foam expansion |
| 1 | 0.684 | 0.052 | 0.145 | 0.120 | 1.00 | 5.34 | 2.47 |
| 2 | 0.646 | 0.054 | 0.184 | 0.116 | 1.00 | 5.19 | 2.27 |
| 3 | 0.684 | 0.052 | 0.145 | 0.120 | 1.00 | 5.31 | 2.33 |
| 4 | 0.750 | 0.088 | 0.050 | 0.113 | 1.00 | 5.79 | 1.97 |
| 5 | 0.750 | 0.040 | 0.200 | 0.010 | 1.00 | 4.71 | 1.33 |
| 6 | 0.750 | 0.100 | 0.077 | 0.073 | 1.00 | 5.43 | 2.07 |
| 7 | 0.726 | 0.057 | 0.174 | 0.042 | 1.00 | 5.01 | 1.73 |
| 8 | 0.750 | 0.100 | 0.113 | 0.037 | 1.00 | 5.1 | 1.87 |
| 9 | 0.731 | 0.010 | 0.178 | 0.081 | 1.00 | 5.09 | 3.67 |
| 10 | 0.731 | 0.010 | 0.178 | 0.081 | 1.00 | 5.08 | 3.50 |
| 11 | 0.750 | 0.051 | 0.138 | 0.061 | 1.00 | 5.05 | 2.07 |
| 12 | 0.632 | 0.100 | 0.167 | 0.101 | 1.00 | 5.22 | 1.43 |
| 13 | 0.711 | 0.076 | 0.095 | 0.119 | 1.00 | 5.51 | 1.73 |
| 14 | 0.711 | 0.094 | 0.184 | 0.010 | 1.00 | 4.96 | 1.40 |
| 15 | 0.695 | 0.100 | 0.139 | 0.066 | 1.00 | 5.19 | 1.77 |

(Continued)

Table 4. I-optimal design results.

| Run | Components | | | | | Response variables | |
|-----|------------|--------|------------|--------|-------|--------------------|----------------|
| | A: water | B: TTO | C: shampoo | D: SLS | Total | pH | Foam expansion |
| 16 | 0.641 | 0.100 | 0.200 | 0.059 | 1.00 | 5.08 | 1.43 |
| 17 | 0.659 | 0.100 | 0.121 | 0.120 | 1.00 | 5.38 | 1.33 |
| 18 | 0.695 | 0.100 | 0.139 | 0.066 | 1.00 | 5.12 | 1.87 |
| 19 | 0.670 | 0.010 | 0.200 | 0.120 | 1.00 | 5.17 | 3.33 |
| 20 | 0.750 | 0.051 | 0.138 | 0.061 | 1.00 | 5.08 | 1.97 |
| 21 | 0.700 | 0.064 | 0.152 | 0.083 | 1.00 | 5.2 | 1.87 |
| 22 | 0.750 | 0.018 | 0.112 | 0.120 | 1.00 | 5.41 | 3.77 |
| 23 | 0.684 | 0.052 | 0.200 | 0.064 | 1.00 | 4.98 | 1.93 |
| 24 | 0.600 | 0.080 | 0.200 | 0.120 | 1.00 | 5.2 | 1.73 |
| 25 | 0.684 | 0.052 | 0.200 | 0.064 | 1.00 | 4.99 | 1.87 |

TTO: tea tree oil; SLS: sodium lauryl sulfate.

Table 5. Masses of each component per experimental run for 30 g solutions.

| Run | Water (g) | TTO (g) | Shampoo (g) | SLS 70% (w/v) (g) | Total mass (g) |
|-----|-----------|---------|-------------|-------------------|----------------|
| 1 | 18.976 | 1.545 | 4.336 | 5.143 | 30.00 |
| 2 | 17.869 | 1.626 | 5.516 | 4.990 | 30.00 |
| 3 | 18.976 | 1.545 | 4.336 | 5.143 | 30.00 |
| 4 | 21.052 | 2.625 | 1.500 | 4.823 | 30.00 |
| 5 | 22.371 | 1.200 | 6.000 | 0.429 | 30.00 |
| 6 | 21.563 | 3.000 | 2.315 | 3.122 | 30.00 |
| 7 | 21.247 | 1.703 | 5.234 | 1.816 | 30.00 |
| 8 | 22.026 | 3.000 | 3.394 | 1.580 | 30.00 |
| 9 | 20.894 | 0.300 | 5.343 | 3.463 | 30.00 |
| 10 | 20.894 | 0.300 | 5.343 | 3.463 | 30.00 |
| 11 | 21.712 | 1.529 | 4.132 | 2.627 | 30.00 |
| 12 | 17.650 | 3.000 | 5.021 | 4.329 | 30.00 |
| 13 | 19.804 | 2.274 | 2.840 | 5.081 | 30.00 |
| 14 | 21.216 | 2.825 | 5.530 | 0.429 | 30.00 |

(Continued)

Table 5. Masses of each component per experimental run for 30 g solutions.

| Run | Water (g) | TTO (g) | Shampoo (g) | SLS 70% (w/v) (g) | Total mass (g) |
|-----|-----------|---------|-------------|-------------------|----------------|
| 15 | 19.999 | 3.000 | 4.156 | 2.845 | 30.00 |
| 16 | 18.451 | 3.000 | 6.000 | 2.549 | 30.00 |
| 17 | 18.215 | 3.000 | 3.642 | 5.143 | 30.00 |
| 18 | 19.999 | 3.000 | 4.156 | 2.845 | 30.00 |
| 19 | 18.557 | 0.300 | 6.000 | 5.143 | 30.00 |
| 20 | 21.712 | 1.529 | 4.132 | 2.627 | 30.00 |
| 21 | 19.936 | 1.934 | 4.571 | 3.560 | 30.00 |
| 22 | 20.957 | 0.548 | 3.353 | 5.143 | 30.00 |
| 23 | 19.694 | 1.547 | 6.000 | 2.759 | 30.00 |
| 24 | 16.457 | 2.400 | 6.000 | 5.143 | 30.00 |
| 25 | 19.694 | 1.547 | 6.000 | 2.759 | 30.00 |

TTO: tea tree oil; SLS: sodium lauryl sulfate.

Statistical analysis of pH

Model definition

Table 6 shows the type I sequential model sum of squares for pH. It is clear that both the quadratic and special cubic model have significant coefficients when compared to the adjacent lower order models. Table 7 shows the model summary statistics for pH. Here it can be seen that both quadratic and special cubic models have the highest values of R^2 statistics and the lowest press. Table 8 shows lack of fit test performed to each model for pH. Lack of fit must be insignificant. That was the case for both quadratic and special cubic models.

Table 6. Type I sequential model sum of squares for pH. In bold are the models most appropriate for fitting pH.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|----------------------|----------------|--------------------|----------------|-------------|---------------|
| Mean | 671.743 | 1 | 671.743 | | |
| Linear | 1.03567 | 3 | 0.34522 | 85.38 | 0.0000 |
| Quadratic | 0.06135 | 6 | 0.01022 | 6.51 | 0.0015 |
| Special cubic | 0.01649 | 4 | 0.00412 | 6.43 | 0.0064 |
| Cubic | 0.00360 | 6 | 0.00060 | 0.87 | 0.5721 |
| Residual | 0.00345 | 5 | 0.00069 | | |
| Total | 672.863 | 25 | 26.91 | | |

Table 7. Model summary statistics for pH.

| Source of variation | Standard error | R^2 | Adjusted R^2 | Predicted R^2 | PRESS |
|----------------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| Linear | 0.0636 | 0.9242 | 0.9134 | 0.8767 | 0.1382 |
| Quadratic | 0.0396 | 0.9790 | 0.9664 | 0.9010 | 0.1110 |
| Special Cubic | 0.0253 | 0.9937 | 0.9863 | 0.8780 | 0.1367 |
| Cubic | 0.0263 | 0.9969 | 0.9852 | | * |

Table 8. Model lack of fit test for pH.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|----------------------|----------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| Linear | 0.0815 | 16 | 0.0051 | 7.38 | 0.0184 |
| Quadratic | 0.0201 | 10 | 0.0020 | 2.91 | 0.1247 |
| Special cubic | 0.0036 | 6 | 0.0006 | 0.8704 | 0.5721 |
| Cubic | 0.0000 | 0 | | | |

As a general rule, one must choose the highest order polynomial that has significant coefficients and insignificant lack of fit. Therefore, the special cubic model was chosen to model the pH response.

Analysis of variance of Ph

Table 9 shows the ANOVA for pH. Both the global model and all its coefficients are significant. These means that linear factors, second order, and third order interactions have a significant effect on mixture pH.

Checking of assumptions for the ANOVA of pH

Figure 1 shows the normal probability plot of residuals and residual independence plot for pH. The figure shows that residuals followed a normal distribution and were randomly distributed. Figure 2 verified the assumption of homoscedasticity. We found homogeneity of variance for the residuals when plotted against factor levels. Table 10 shows the analytical tests performed to confirm the validity of all the assumptions. All test were insignificant. Thus, the ANOVA obtained for pH had statistical validity.

Table 9. ANOVA for pH.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|---------------------|----------------|--------------------|-------------|--------|---------------|
| Model | 1.11 | 13 | 0.0857 | 133.58 | <0.0001 |
| Linear mixture | 1.04 | 3 | 0.3452 | 538.37 | <0.0001 |
| AB | 0.0110 | 1 | 0.0110 | 17.21 | 0.0016 |
| AC | 0.0061 | 1 | 0.0061 | 9.56 | 0.0103 |
| AD | 0.0072 | 1 | 0.0072 | 11.29 | 0.0064 |
| BC | 0.0117 | 1 | 0.0117 | 18.25 | 0.0013 |
| BD | 0.0071 | 1 | 0.0071 | 11.09 | 0.0067 |
| CD | 0.0037 | 1 | 0.0037 | 5.74 | 0.0355 |
| ABC | 0.0114 | 1 | 0.0114 | 17.71 | 0.0015 |
| ABD | 0.0056 | 1 | 0.0056 | 8.74 | 0.0131 |
| ACD | 0.0035 | 1 | 0.0035 | 5.49 | 0.0389 |
| BCD | 0.0104 | 1 | 0.0104 | 16.20 | 0.0020 |
| Residual | 0.0071 | 11 | 0.0006 | | |
| Lack of fit | 0.0036 | 6 | 0.0006 | 0.8704 | 0.5721 |
| Pure error | 0.0035 | 5 | 0.0007 | | |
| Total | 1.12 | 24 | | | |

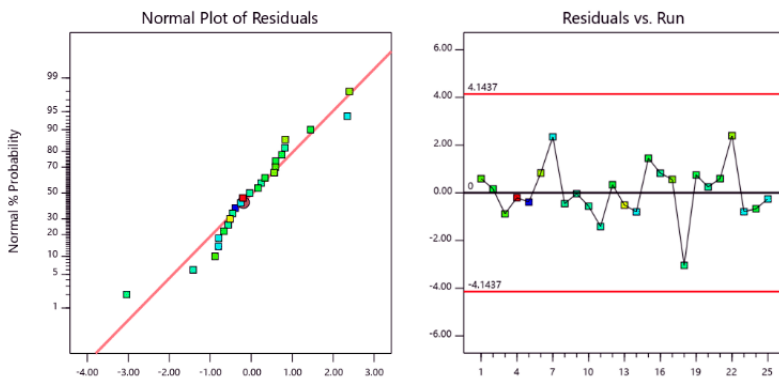


Figure 1. Normal probability plot of residuals and residuals versus run order plot for pH.

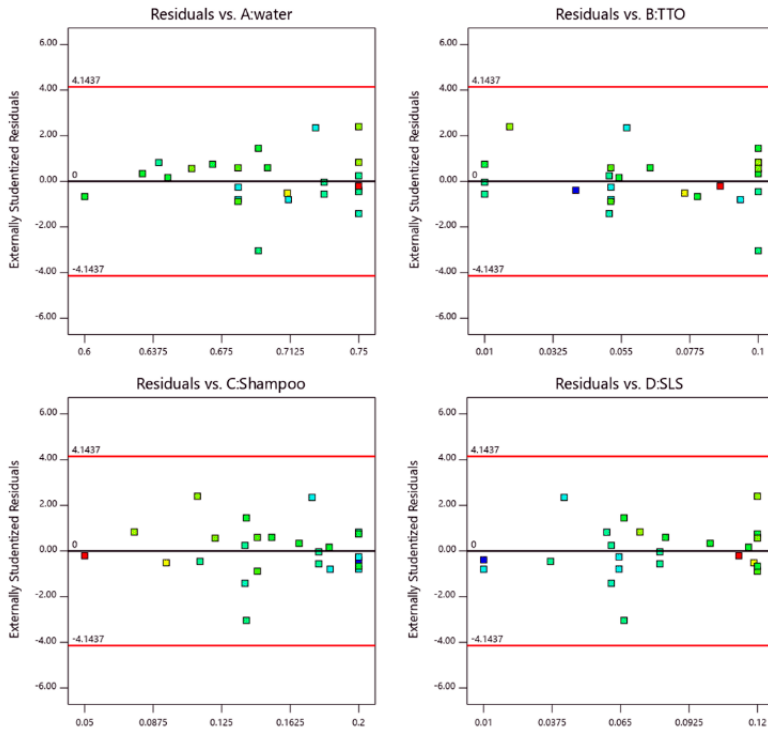


Figure 2. Homoscedasticity of residuals. Residuals versus factor plots for pH.

Table 10. Analytical test of normality of residuals (Shapiro-Wilk test), homoscedasticity of residuals (Levene’s test), and residuals independence (Durbin-Watson test) for pH.

| Test | Statistic | P-Value |
|---------------|-----------|---------|
| Shapiro-Wilk | 0.9625 | 0.4798 |
| Levene’s A | 0.7445 | 0.7053 |
| Levene’s B | 1.3175 | 0.3273 |
| Levene’s C | 0.7114 | 0.7310 |
| Levene’s D | 2.8172 | 0.0526 |
| Durbin-Watson | 1.9291 | 0.4318 |

RSM analysis T3

The regression model obtained for pH in L_Pseudo Components was:

$$\begin{aligned}
 \text{pH} = & 2.60215\mathbf{A} + 0.345148\mathbf{B} + 2.74679\mathbf{C} + \\
 & 3.97648\mathbf{D} + 14.9644\mathbf{AB} + 7.42241\mathbf{AC} + \\
 & 9.90214\mathbf{AD} + 14.6188\mathbf{BC} + 14.2399\mathbf{BD} + \\
 & 6.75326\mathbf{CD} - 26.9975\mathbf{ABC} - 22.3494\mathbf{ABD} - \\
 & 12.4994\mathbf{ACD} - 27.3661\mathbf{BCD}
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

Since the model and all its coefficients were found significant (see table 9), and no structure was found in the residuals (see figure 2), the regression model was considered suitable for modeling pH. Figure 3 shows a contour plot of pH with TTO proportion equal to 0.07. This scenario was considered important since one of the aims of this work was to maximize TTO ratio while maintaining an adequate pH value. From the figure, it was inferred that higher ratios of shampoo decreased pH while higher ratios of SLS increased it.

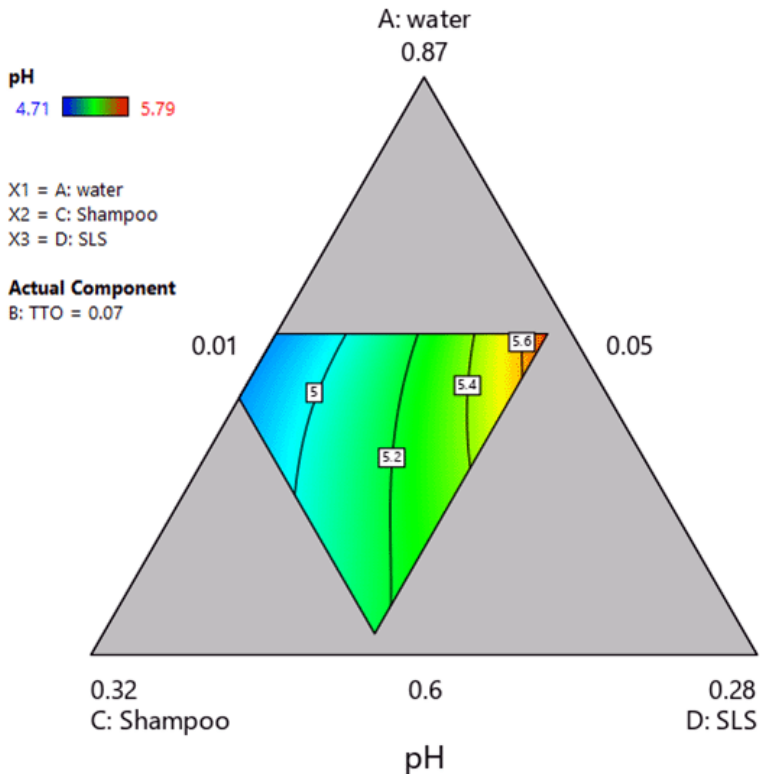


Figure 3. Contour plot of pH with TTO proportion equal to 0.07.

Statistical analysis of foam expansion

Model definition T3

Table 11 shows the type I sequential model sum of squares for foam expansion. Table 12 shows the model summary statistics for foam expansion. Table 13 shows lack of fit test performed to each model for foam expansion. Only the special cubic model has insignificant lack of fit and significant type I sequential sum of squares. Consequently, the special cubic model was chosen for modeling foam expansion.

Table 11. Type I sequential model sum of squares for foam expansion. In bold are the models most appropriate for fitting foam expansion.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|----------------------|----------------|--------------------|---------------|-------------|---------------|
| Mean | 111.09 | 1 | 111.09 | | |
| Linear | 9.05 | 3 | 3.02 | 19.63 | <0.0001 |
| Quadratic | 2.78 | 6 | 0.4625 | 15.32 | <0.0001 |
| Special cubic | 0.2668 | 4 | 0.0667 | 3.95 | 0.0317 |
| Cubic | 0.1509 | 6 | 0.0252 | 3.59 | 0.0909 |
| Residual | 0.0350 | 5 | 0.0070 | | |
| Total | 123.37 | 25 | 4.93 | | |

Table 12. Model summary statistics for foam expansion.

| Source of variation | Standard error | R^2 | Adjusted R^2 | Predicted R^2 | Press |
|----------------------|----------------|--------|----------------|-----------------|-------|
| Linear | 0.3921 | 0.7372 | 0.6996 | 0.6021 | 4.89 |
| Quadratic | 0.1737 | 0.9631 | 0.9410 | 0.8344 | 2.03 |
| Special cubic | 0.1300 | 0.9849 | 0.9670 | 0.7188 | 3.45 |
| Cubic | 0.0837 | 0.9971 | 0.9863 | | * |

Table 13. Model lack of fit test for foam expansion.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|----------------------|----------------|--------------------|---------------|-------------|---------------|
| Linear | 3.19 | 16 | 0.1996 | 28.51 | 0.0008 |
| Quadratic | 0.4177 | 10 | 0.0418 | 5.97 | 0.0311 |
| Special cubic | 0.1509 | 6 | 0.0252 | 3.59 | 0.0909 |
| Cubic | 0.0000 | 0 | | | |

Analysis of variance of foam expansion

Table 14 shows the ANOVA for foam expansion. Non-significant model terms were excluded from the special cubic model. Model global significance analysis was significant. Similarly, all the model coefficients were found significant. These means that the linear mixture and AB, AC, AD, CD, ABC, ABD, and ACD interactions had a significant effect on mixture foam expansion.

Table 14. ANOVA for foam expansion.

| Source of variation | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F_0 | P-Value |
|---------------------|----------------|--------------------|-------------|--------|---------|
| Model | 12.06 | 10 | 1.21 | 77.27 | <0.0001 |
| Linear mixture | 9.05 | 3 | 3.02 | 193.32 | <0.0001 |
| AB | 0.5456 | 1 | 0.5456 | 34.95 | <0.0001 |
| AC | 0.2383 | 1 | 0.2383 | 15.27 | 0.0016 |
| AD | 0.3963 | 1 | 0.3963 | 25.39 | 0.0002 |
| CD | 0.1517 | 1 | 0.1517 | 9.72 | 0.0076 |
| ABC | 0.7320 | 1 | 0.7320 | 46.90 | <0.0001 |
| ABD | 1.23 | 1 | 1.23 | 78.83 | <0.0001 |
| ACD | 0.0904 | 1 | 0.0904 | 5.79 | 0.0305 |
| Residual | 0.2185 | 14 | 0.0156 | | |
| Lack of fit | 0.1835 | 9 | 0.0204 | 2.91 | 0.1258 |
| Pure error | 0.0350 | 5 | 0.0070 | | |
| Total | 12.28 | 24 | | | |

Checking of assumptions for the ANOVA of foam expansion

Figure 4 shows the normal probability plot of residuals and residual independence plot for foam expansion. Residuals followed a normal distribution and were randomly distributed. Figure 5 verified the assumption of homoscedasticity. We found homogeneity of variance for the residuals when plotted against factor levels. Table 15 shows the analytical tests performed to confirm the validity of all the assumptions. All test were insignificant. Thus, the ANOVA obtained for foam expansion had statistical validity.

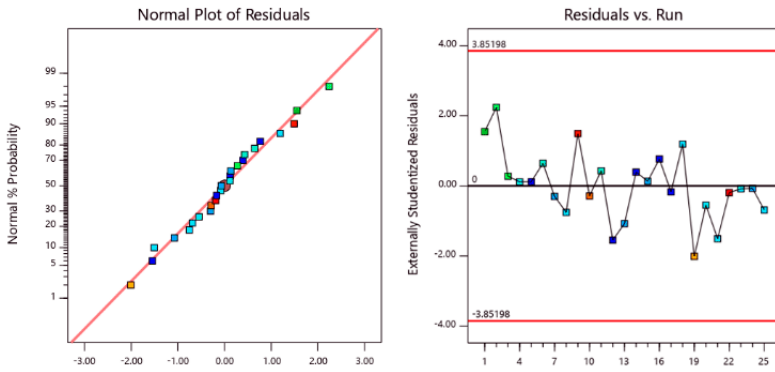


Figure 4. Normal probability plot of residuals and residuals versus run order plot for foam expansion.

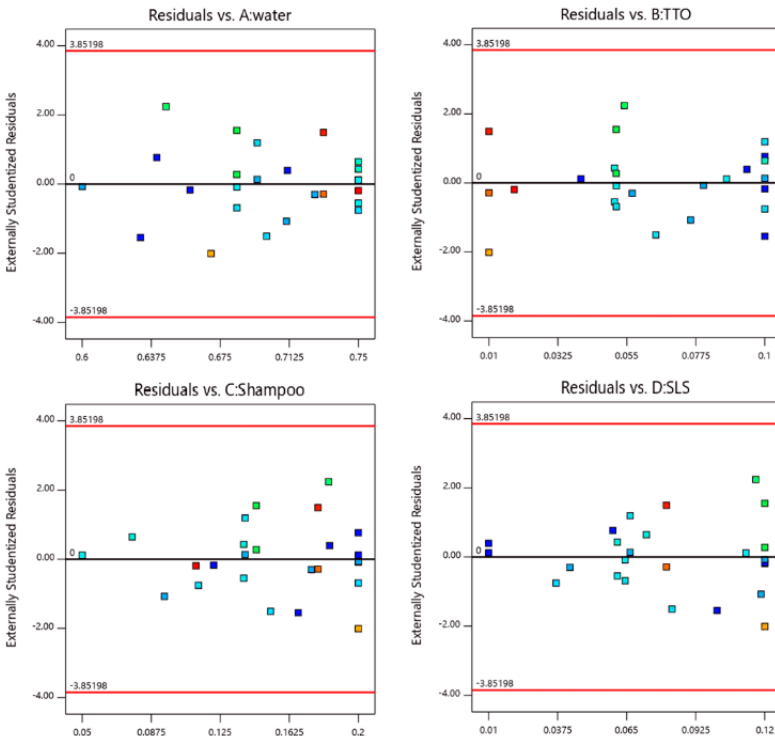


Figure 5. Homoscedasticity of residuals. Residuals versus factor plots for foam expansion.

Table 15. Analytical test of normality of residuals (Shapiro-Wilk test), homoscedasticity of residuals (Levene's test), and residuals independence (Durbin-Watson test) for foam expansion.

| Test | Statistic | P-Value |
|---------------|-----------|---------|
| Shapiro-Wilk | 0.9678 | 0.5991 |
| Levene's A | 0.4120 | 0.9378 |
| Levene's B | 2.5442 | 0.0646 |
| Levene's C | 0.4081 | 0.9398 |
| Levene's D | 1.1533 | 0.4190 |
| Durbin-Watson | 1.5002 | 0.1091 |

RSM analysis

The regression model obtained for foam expansion in L_Pseudo Components was:

$$\begin{aligned} \text{Foam expansion} = & -7.40073\mathbf{A} + 6.0069\mathbf{B} - \\ & 3.74901\mathbf{C} - 8.0221\mathbf{SLS} + 25.7836\mathbf{AB} + \\ & 29.3481\mathbf{AC} + 51.4201\mathbf{AD} + 31.9566\mathbf{CD} - \\ & 68.2098\mathbf{ABC} - 108.8\mathbf{ABD} - 58.1821\mathbf{ACD} \end{aligned} \quad (5)$$

Considering that the model and all its coefficients were significant (see table 14), and there was no structure in the residuals (see figure 5), the regression model was found suitable for modeling foam expansion. Similar to section 3.3.4, figure 6 shows a contour plot of foam expansion with TTO proportion equal to 0.07. From the plot, it can be concluded that the high ratio of TTO substantially affected the ability of the mixture to form foam, since the available foam expansion range was reduced to values between 1.3 and 2.2 in the region of experimentation. Besides, it was found that SLS tended to increase foam expansion while shampoo ratio had a lowering effect on it.

RSM discussion

From the results above, it was found that there were significant linear, second and third order interactions between the chosen factors concerning their effect on pH and foam formation. TTO concentration greatly influenced foam expansion and pH leveling. We found that higher SLS values could have been employed to obtain higher foaming capabilities. However, this entailed the cost of increasing the risk of skin irritation and dryness given its effect on solution pH and surface tension. Shampoo was used to control pH by its buffering capabilities. However, its high viscosity and lack of sufficient surfactant composition made it unsuitable to act as a lone emulsifier of TTO and foaming agent. Water concentration also played a crucial role in the solution. Lower

water ratios were correlated to less foam expansion when higher ratios of shampoo were used. Higher ratios of water with higher ratios of SLS increased foam expansion, but also induce higher pH values, reducing its suitability for topical eyelid application.

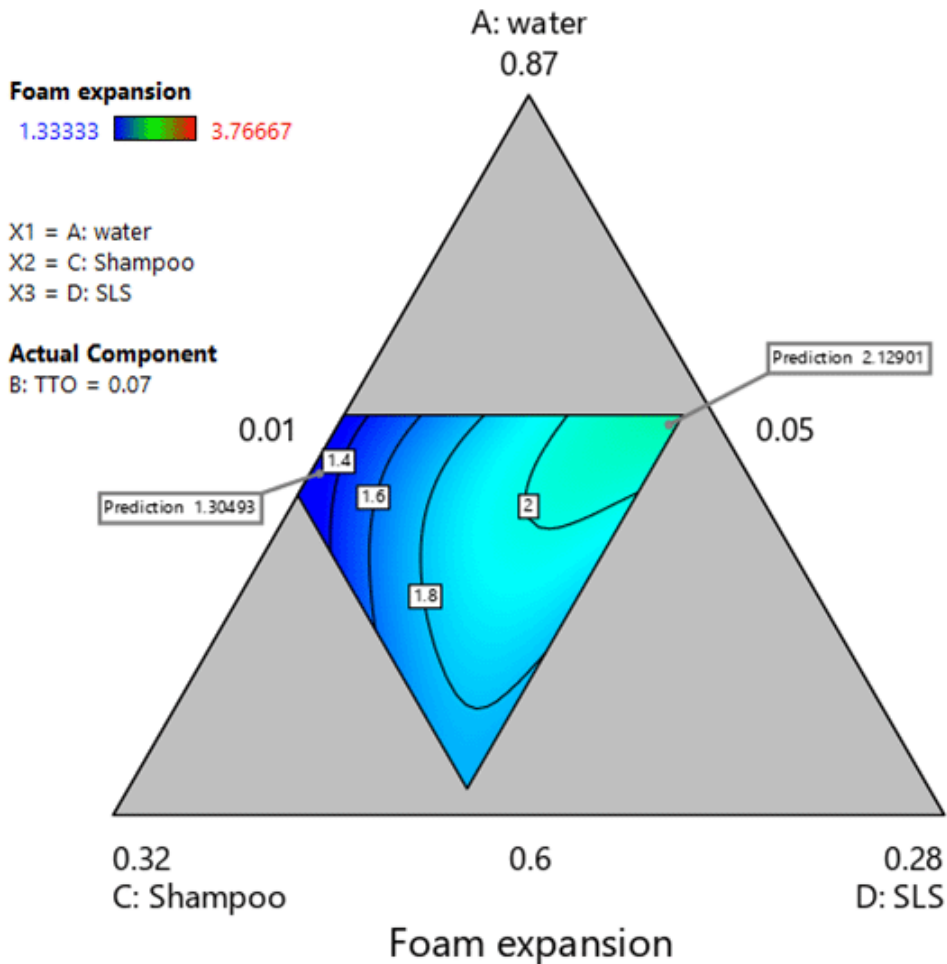


Figure 6. Contour plot of foam expansion with TTO proportion equal to 0.07.

Multiple response optimization

Ideally, the optimal mixture would have been the one with a pH equal to 5, foam expansion greater than 3 and TTO ratio equal to 0.1. However, compromises in every aspect had to be made to find a suitable but not ideal mixture. Multiple numerical optimization runs were made to obtain the ideal mixture. It was found that there were no optimal solutions which accomplished the desirable responses and TTO ratio. Hence,

an optimization criterion was established, which allowed the search of a mixture formulation that was as close as possible to the ideal one. Table 16 shows the optimization criteria used.

We chose the TTO ratio to lie between 7% and 10% to obtain an optimal effect on Demodex and bacterial eradication. In addition, pH value was considered suitable if it was lower than 5.3 and higher than 4.8. These criteria were established considering that skin exposure time to the optimized solution would be less than 30 seconds. Hence, even though pH might be slightly above or below the recommended value, its effect would not be severely detrimental to skin health in such a short time. Foam expansion was established to be a minimum of 1.90. This value was found to be sufficient for foam to be formed when testing the solution with a foam pump sprayer commonly used for application of these type of solutions. All the other components criteria corresponded to the ranges defined for them in table 1.

Table 16. Optimization criteria for desired solution.

| Lower bound (Li) | | Component | | Upper bound (Ui) |
|------------------|---|-----------------------|---|------------------|
| 0.60 | ≤ | A: water | ≤ | 0.75 |
| 0.07 | ≤ | B: TTO | ≤ | 0.10 |
| 0.05 | ≤ | C: shampoo | ≤ | 0.20 |
| 0.01 | ≤ | D: SLS | ≤ | 0.12 |
| 4.8 | ≤ | pH | ≤ | 5.3 |
| 1.95 | ≤ | Foam expansion | ≤ | 3.7667 |

Figure 7 shows an overlay contour plot of pH and foam expansion considering the defined optimization criteria and a TTO ratio constant and equal to 0.07. The figure also shows the optimal design region in yellow, which is relatively big enough for withstanding small variations in component proportions.

Table 17 shows the optimized formulation obtained using the optimization algorithm provided by the software Design-Expert version 11. The table also shows the masses of each component for preparing an 80 g solution and the total cost associated for preparing it. This total mass is chosen since it is the common one found on commercial eyelid cleaning solutions. As can be seen, the optimized solution cost less than 2 USD. Commercial foaming solutions containing TTO in unknown concentrations have prices of at least 20 USD. Therefore, the proposed alternative is cost-effective for a treatment that is considered indefinite in patients with blepharitis.

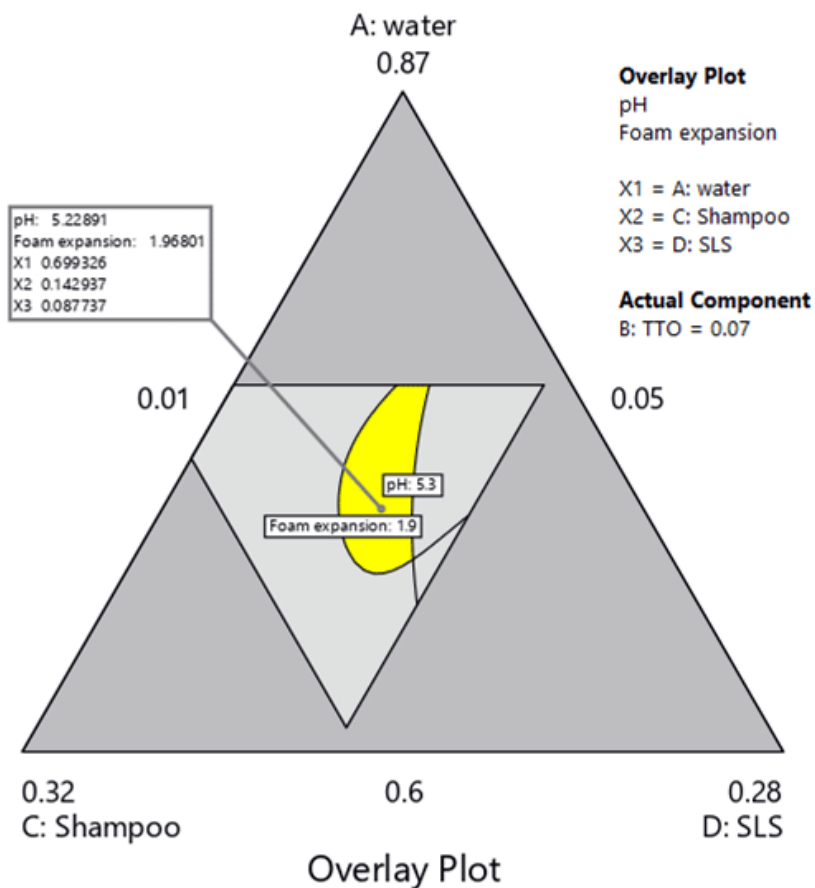


Figure 7. Overlay plot of pH and foam expansion, with TTO ratio equal to 0.07. The region in yellow corresponds to the identified design region.

Table 17. Optimized formulation for 80 g solution.

| Component | Proportion | Mass (g) | Price per gram (USD) | Total price (USD) |
|-----------------------|------------|----------|----------------------|-------------------|
| A: water | 0.699326 | 55.94608 | <0.00002 | 0.000112 |
| B: TTO | 0.07 | 5.6 | 0.3 | 1.68 |
| C: shampoo | 0.142937 | 11.43496 | 0.016 | 0.182959 |
| D: SLS | 0.087737 | 7.01896 | 0.002 | 0.014038 |
| Total | | | | 1.877109 |
| pH | | 5.22891 | | |
| Foam expansion | | 1.96801 | | |

CONCLUSIONS

This work proposes a low-cost eyelid cleaning foaming solution for symptom management in patients with blepharitis. An optimized formulation of water, TTO, Baby shampoo, and SLS was found by performing a four-component mixture I-optimal design of experiment. To our knowledge, this is the first study which establishes adequate concentrations of active compounds as a DIY solution. Statistical analysis showed the presence of significant linear, second and third order interactions between components, which together defined regions of high and low pH and foam expansion values.

TTO was found to induce low foam expansion and, even though it by itself did not alter to a significant degree the solution pH, its interaction with the other components was determinant in the definition of an adequate design region where optimal pH and foam expansion values could be obtained. SLS and shampoo performed antagonistic roles in the formulation. The first tended to increase foam expansion and pH values, while the former decreased pH but didn't necessarily promote foam expansion to a high degree when high TTO ratios were also present. Through the use of both numerical and graphical optimization methods, an optimal design region was found, and an optimal formulation was determined. The obtained formulation contained a significant ratio of TTO and resulted in suitable pH and foam expansion values. The low cost and ease of preparation of the formulation make it an affordable, effective alternative in the treatment of both anterior and posterior chronic blepharitis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the 757 call from Colciencias and the Office of Management and Academic Development of the Universidad del Norte. None of the authors have affiliations with any organization with any financial or non-financial interest in the subject matter and methods discussed in this manuscript.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. T.H. Rim, M.J. Kang, M. Choi, K.Y. Seo, S.S. Kim, Ten-year incidence and prevalence of clinically diagnosed blepharitis in South Korea: a nationwide population-based cohort study, *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, **45**(5), 448-454 (2017).
2. P.A. Chachre, S.S. Mulik, D.B. Kadam, S.S. Mulik, A critical review on blepharitis and its ayurvedic approach, *Asian J. Multidiscipl. Studies*, **5**(10), 54-56 (2017).
3. K. Lindsley, S. Matsumura, E. Hatem, E.K. Akpek, Interventions for chronic blepharitis. Vol. 5, *The Cochrane database of systematic reviews*, 2012. p. CD005556.
4. J.P. McCulley, J.M. Dougherty, Blepharitis associated with acne rosacea and seborrheic dermatitis, *Int. Ophthalmol. Clin.*, **25**(1), 159-172 (1985).
5. J. Liu, H. Sheha, S.C.G. Tseng, Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis, Vol. 10, *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2010. p. 505-510.
6. W.D. Mathers, W.J. Shields, M.S. Sachdev, W.M. Petroll, J.V. Jester, Meibomian gland dysfunction in chronic blepharitis, *Cornea*, **10**(4), 277-285 (1991).
7. D. Czepita, W. Kuźna-Grygiel, M. Czepita, A. Grobelny, Demodex folliculorum and Demodex brevis as a cause of chronic marginal blepharitis, *Ann. Acad. Med. Stetin.*, **53**(1), 63-67 (2007).
8. M. Arrua, M. Samudio, N. Fariña, D. Cibils, F. Laspina, R. Sanabria *et al.*, Comparative study of the efficacy of different treatment options in patients with chronic blepharitis, *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, **90**(3), 112-118 (2015).
9. J.E. Key, A comparative study of eyelid cleaning regimens in chronic blepharitis, *CLAO J.*, **22**(3), 209-212 (1996).
10. A.R. Thode, R.A. Latkany, Current and emerging therapeutic strategies for the treatment of meibomian gland dysfunction (MGD), *Drugs*, **75**(11), 1177-1185 (2015).
11. Y.Y. Gao, M.A. Di Pascuale, W. Li, A. Baradaran-Rafii, A. Elizondo, C.L. Kuo *et al.*, *In vitro* and *in vivo* killing of ocular Demodex by tea tree oil, *Br. J. Ophthalmol.*, **89**(11), 1468-1473 (2007).
12. J. Thomas, C.F. Carson, G.M. Peterson, S.F. Walton, K.A. Hammer, M. Naunton *et al.*, Therapeutic potential of tea tree oil for scabies, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **94**(2), 258-266 (2016).

13. N.P. Emptage, N. Collins, D. Mizuiri, J. Ravetto, F.C. Lum, *Blepharitis*, American Academy of Ophthalmology, 2013.
14. H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, P. Finkel, Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **28**(5), 359-370 (2006).
15. R.A. Tupker, C. Willis, E. Berardesca, C.H. Lee, M. Fartasch, T. Agner *et al.*, Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the standardization group of the European society of contact dermatitis, *Contact Dermatitis*, **37**, 53-69 (1997).
16. R. Myers, D. Montgomery, C. Anderson-Cook, *Response surface methodology*, 4th Ed., John Wiley & Sons, 2016, p. 855.
17. P. Goos, B. Jones, U. Syafitri, I-optimal design of mixture experiments, *J. Am. Stat. Assoc.*, **111**(514), 899-911 (2016).
18. J.A. Cornell, *A primer on experiments with mixtures*, John Wiley & Sons, Gainesville, 2011, p. 368.
19. Y.Y. Gao, M.A. Di Pascuale, A. Elizondo, S.C. Tseng, Clinical treatment of ocular demodex by lid scrub with tea tree oil, *Cornea*, **26**(2), 136-143 (2007).
20. A.C. de Groot, E. Schmidt, Tea tree oil: contact allergy and chemical composition, *Contact Dermatitis*, **75**(3), 129-143 (2016).
21. C.J. Lee, L.W. Chen, L.G. Chen, T.L. Chang, C.W. Huang, M.C. Huang *et al.*, Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation, *J. Food Drug Anal.*, **21**(2), 169-176 (2013).
22. N. Halligudi, M.S. Al-Khudori, Evaluation of cosmetic properties of different brands of shampoos from multinational brands in Oman, *J. Drug Discov. Ther.*, **1**(7), 91-96 (2013).
23. M. Moldovan, S. Părăuan, Cosmetic evaluation of some commercial shampoos, *Clujul Med.*, **85**(3), 378-383 (2012).
24. B.T. AlQuadeib, E.K.D. Eltahir, R.A. Banafa, L.A. Al-Hadhairi, Pharmaceutical evaluation of different shampoo brands in local Saudi market, *Saudi Pharm. J.*, **26**(1), 98-106 (2017).

25. A. Wibbertmann, I. Mangelsdorf, K. Gamon, R. Sedlak, Toxicological properties and risk assessment of the anionic surfactants category: Alkyl sulfates, primary alkane sulfonates, and alpha-olefin sulfonates, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74**(5), 1089-1106 (2011).
26. Expert Panel, Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulfate and ammonium lauryl sulfate, *Int. J. Toxicol.*, **2**(7), 127-181 (1983).
27. C.H. Lee, H.I. Maibach. Sodium Lauryl Sulfate. In: *Irritant dermatitis*, Springer, Berlin, 2006. p. 257-267.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

F.J. Burgos-Flórez, R. de las Salas, A prototype of a low-cost eyelid cleaning foaming solution for symptom management in patients with chronic blepharitis: An I-optimal mixture experimental design, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 615-642 (2019).

Aplicación de un diseño factorial 2^3 en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*

Wilson Ávila Ávila*, Oscar J. Medina Vargas**, Lucía M. Moreno Bastidas***

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

* Correo electrónico: wilson.avila@uptc.edu.co

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

*** Correo electrónico: lucia.moreno@uptc.edu.co

Recibido para evaluación: 12 de febrero de 2019

Aceptado para publicación: 10 de septiembre de 2019

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium meridionale*) forma parte de la familia Ericaceae; es un fruto rico en compuestos polifenólicos como antocianinas y flavonoides con propiedades antioxidantes, compuestos que presentan algunas características para la inhibición de radicales libres. Se empleó un diseño factorial 2^3 para investigar los efectos de las variables temperatura, tiempo y el porcentaje de etanol en la extracción asistida por microondas (MAE) de los antioxidantes presentes en frutos de arándanos, como técnica alternativa, con la cual se pretende una economía destacable en cuanto al empleo de disolventes, tiempo y energía, en comparación con los procesos de extracción convencionales. Las extracciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: temperatura (343,15 -383,15 K), tiempo (5-15 minutos), %EtOH (0-80%). Se planteó un diseño factorial, con un total de 8 experimentos para determinar la influencia de la relación de las variables en el proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante por el método de DPPH-, obteniendo un modelo factorial de primer orden con interacciones, bajo un nivel de confianza del 100% y $R^2=1$. El diseño experimental y la evaluación de los resultados se realizó con el software R Studio® versión libre.

Palabras clave: DPPH-, *Vaccinium meridionale*, MAE, diseño factorial, antioxidantes.

SUMMARY

Application of a 2³ factorial design in the assisted extraction by microwave and evaluation of the antioxidant activity of the compounds present in *Vaccinium meridionale* fruits

Blueberry (*Vaccinium meridionale*) forms part of the family Ericaceae; it is a fruit rich in flavonoids and anthocyanins (polyphenols), which have antioxidant properties and also shows some properties suitable for inhibition of free radicals. A 2³ factorial design was performed to investigate the variables effects: temperature, time and the ethanol percentage %, on the antioxidants extraction process by Microwave Assisted Extraction (MAE). The extraction conditions were: temp (343.15-383.15 K), time (5-15 min), ethanol (0- 80%). A factorial design was performed, with a total of 8 experiments, allowing to determine the influence of the relation of the variables related to the extraction process of compounds with antioxidant activity by DPPH· method, getting a first order factorial model with interactions and a 100% reliability level and a R² =1. The experimental design and evaluation of the results were performed with the software R Studio® free version.

Key words: DPPH·, *Vaccinium meridionale*, MAE, factorial design, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida actual de la humanidad ha causado la sobreproducción de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el cuerpo humano, incrementando los niveles de estrés oxidativo [1]. El estrés oxidativo está asociado con el incremento de enfermedades tales como: diabetes, hipertensión, obesidad, cáncer, entre otras [2]; sin embargo, los antioxidantes son capaces de neutralizar y eliminar radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno [3], protegiendo el cuerpo humano y evitando así el estrés oxidativo y las enfermedades asociadas [4].

El arándano (*Vaccinium meridionale*) forma parte de la familia *Ericaceae*, es un fruto nativo, que en Colombia se conoce como agraz o mortiño [1]; es aprovechado por comunidades rurales, que recolectan sus frutos en regiones (Departamentos) como Boyacá, Antioquia y Cundinamarca, de forma silvestre. Este fruto crece en altitudes de (2200-3400 m s.n.m.) [5, 6] y se puede considerar como una fruta rica en compuestos interesantes, antocianinas y flavonoides, los cuales contienen compuestos antioxidantes [7], con estructuras químicas que presentan algunas características que los hacen idóneos para estabilizar o desactivar radicales libres en el cuerpo humano [2].

En cuanto a técnicas de extracción de antioxidantes, se destaca la extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) [8, 9]. En este tipo de procesos, una muestra de material vegetal inmerso en un solvente de naturaleza orgánica se expone a radiación microondas bajo condiciones controladas de temperatura y presión [10].

Consecuentemente, las moléculas de agua presentes en los sistemas vasculares de las plantas rompen los tejidos, liberan las biomoléculas allí contenidas y son progresivamente incorporadas al solvente [11]. Las ventajas de este proceso son los cortos tiempos de extracción, y una mayor eficiencia en uso de reactivos, y consecuente rendimiento de la reacción, así como una disminución en los costos, entre otras [12].

La metodología de diseño factorial 2K se ha convertido en una herramienta útil para la realización de diseños experimentales [13] que permiten la determinación de puntos altos y bajos de las condiciones de operación, a partir del análisis de los factores que afectan el valor de respuesta determinada, y un número de puntos experimentales relativamente pequeño [14]. En este caso, la metodología de diseño factorial 2K se ha empleado para determinar las condiciones de operación del equipo de microondas y extraer antioxidantes del fruto *Vaccinium meridionale* mediante MAE [15], en la que intervienen 3 variables.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las condiciones de extracción de antioxidantes vía MAE teniendo en cuenta diferentes rangos de factores como: temperatura (T), tiempo (t) y concentración del solvente de extracción (% etanol) [16], en la obtención de antioxidantes a partir de frutos de *Vaccinium meridionale*, con ayuda de un procedimiento colorimétrico, que emplea el reactivo de DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) [17, 18].

El método de DPPH· se basa en la reducción del radical DPPH· por los antioxidantes contenidos en la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes [19]. La decoloración del radical se determina a la longitud de onda (λ) de 515 nm, hasta alcanzar el equilibrio. Las ventajas de este método son que el ensayo DPPH· es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado [20]. La desventaja, es que el reactivo sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH· [21].

METODOLOGÍA

El diseño experimental utilizado es un diseño tipo factorial 2K, con un valor de $k=3$. Se evaluaron los efectos de las variables seleccionadas: temperatura, tiempo y %EtOH

en frutos secos de *Vaccinium meridionale* con variables codificadas A, B y C respectivamente. En la tabla 1 se presentan los valores límite de estas variables, desde los niveles altos (+) y bajos (-) de experimentación [13, 14].

Tabla 1. Variables y niveles del diseño experimental.

| Variable | Nivel bajo (-1) | Nivel alto (+1) |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| A = temperatura (K) | 343,15 | 383,15 |
| B = tiempo (min) | 5 | 15 |
| C= % etanol (%EtOH) | 0 | 80 |

Tabla 2. Diseño experimental factorial codificado y variables reales.

| Orden | Temperatura (K) | Tiempo (min) | % etanol (%EtOH) |
|-------|-----------------|--------------|------------------|
| 1 | -1 (343,15) | -1 (5) | -1 (0) |
| 2 | 1 (383,15) | -1 (5) | -1 (0) |
| 3 | -1 (343,15) | 1 (15) | -1 (0) |
| 4 | 1 (383,15) | 1 (15) | -1 (0) |
| 5 | -1 (343,15) | -1 (5) | 1 (80) |
| 6 | 1 (383,15) | -1 (5) | 1 (80) |
| 7 | -1 (343,15) | 1 (15) | 1 (80) |
| 8 | 1 (383,15) | 1 (15) | 1 (80) |

Se logró encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la variable de respuesta TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y el conjunto de variables seleccionadas [22]. Se modeló la respuesta mediante regresión lineal de los factores, por medio de análisis de regresión lineal del diseño factorial, cuya función de aproximación es un modelo empírico de primer orden con interacciones según la ecuación (1). Los ensayos se ejecutaron por triplicado, aleatoriamente, para garantizar la validez estadística de los resultados [13, 22]:

$$y = \beta^{\circ} + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{13} A_1 B_2 + \varepsilon(\pm) \quad \text{Ecuación(1)}$$

Y: variable dependiente, TEAC Trolox (mg/g fruto seco)

A, B, C: variables independientes, (temperatura, tiempo, %EtOH)

β° : punto en el cual la recta intercepta el eje (ordenada en el origen)

β_1 : pendiente de la recta

ε : error aleatorio.

INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

Se empleó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), de marca Merck™ como antioxidante de referencia, y DPPH· (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), Merck™. Los frutos frescos de la especie *Vaccinium meridionale* fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Tunja (Boyacá); posteriormente se analizaron en el Laboratorio de Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja, Boyacá) [14, 16, 19].

Los frutos se lavaron con agua destilada para remoción de impurezas tales como hojas, tierra y cuerpos extraños. Las muestras se sometieron a un proceso de secado bajo estufa con recirculación de aire, durante 2 horas a una temperatura de 45 °C grados. El registro de los espectros de absorción y las medidas de absorbancia, a longitud de onda fija, se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Hach DR 5000. Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del *software* R Studio® versión libre [14, 23].

Para la obtención de los extractos del fruto *Vaccinium meridionale* se pesaron 200 mg de fruta seca y se mezclaron con 20 ml de la mezcla solvente {EtOH (del 96%) + agua} en porcentajes EtOH 0% (-1) y EtOH 80% (+1) a tiempo de 5 minutos (-1) y 15 minutos (+1) y temperatura de 343,15 K (-1) y 383,15 K (+1). Posteriormente, las muestras se llevaron al sistema microondas Sineo MDS-8G empleando las condiciones propuestas para el diseño experimental [14, 16]. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm, durante de 15 min, en una Centrífuga Hettich Rotina™. El sobrenadante obtenido se conservó para análisis posteriores y se denominó el extracto. Los extractos totalmente acuosos se almacenaron en un refrigerador a 4 °C, y los extractos con etanol en un congelador a -4 °C. Estos últimos extractos fueron analizados dentro de un período no superior a 24 horas después de la extracción para no comprometer la integridad de los analitos.

Actividad antioxidante método DPPH·: este método, desarrollado por Brand *et al.* [23], se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH·, por los antioxidantes presentes en la muestra. Con modificaciones el método descrito por Kim *et al.* [24], se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH· 100 mmol/L disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Después, se añade 0,2 mmol/L de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm

se realizan antes de añadir la muestra (A_0) y pasados los 30 minutos (A_f). La concentración de DPPH· en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o actividad equivalente a Trolox (mg/g de muestra peso seco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mmol/L en disolución de metanol al 80%, se analiza bajo las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes Trolox) (mg/g fruto seco) [19].

Finalmente, para la determinación de actividad antioxidante por DPPH· se traza una curva de calibración para la técnica utilizando Trolox como compuesto antioxidante de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de obtener los diferentes extractos de *Vaccinium meridionale* se preparó una curva de calibración para la técnica utilizando Trolox como compuesto antioxidante de referencia [23], utilizando 5 soluciones patrón. La curva obtenida presenta un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9981$ (ver figura y tabla 3).

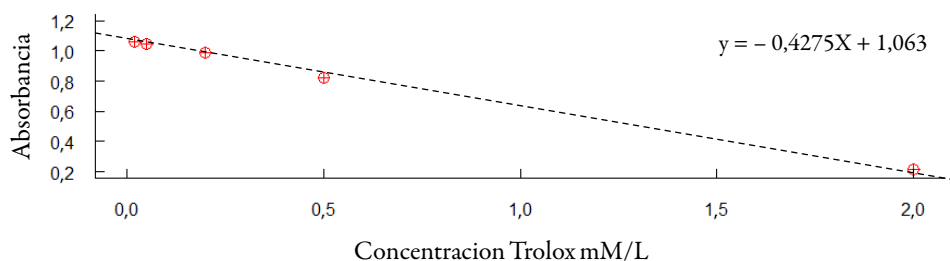


Figura 1. Curva de calibración DPPH·.

Tabla 3. Resumen del ANOVA, curva de calibración DPPH·.

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | Fuente | GL | SC | MC | F | P |
|---------|---------|--------------------|-----------|----|----------|----------|---------|-------|
| 0,01808 | 99,81 | 99,74 | Regresión | 1 | 0,504212 | 0,504212 | 1540,91 | 0,000 |
| | | | Error | 3 | 0,000982 | 0,000327 | | |
| | | | Total | 4 | 0,505193 | | | |

Posteriormente se determinó el % de inhibición de acuerdo con la ecuación (2):

$$\%inhibición = \left[\frac{(A_m - A_p)}{A_m} \right] * 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

Am: absorbancia de la muestra control, se toma al inicio de la prueba.

Ap: absorbancias del patrón o muestras de los extractos las diferentes concentraciones.

Se graficó concentración de Trolox (mmol/L) y el porcentaje de inhibición para determinación de la actividad antioxidante TEAC. La curva de calibración, con las variables %inhibición vs. concentración de Trolox, mostró un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9981$ (ver tabla 4).

Tabla 4. Resumen del ANOVA, curva de calibración DPPH· % de inhibición.

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | Fuente | GL | SC | MC | F | P |
|---------|---------|--------------------|-----------|----|---------|---------|---------|-------|
| 1,67101 | 99,81 | 99,74 | Regresión | 1 | 4290,32 | 4290,32 | 1536,49 | 0,000 |
| | | | Error | 3 | 8,38 | 2,79 | | |
| | | | Total | 4 | 4298,70 | | | |

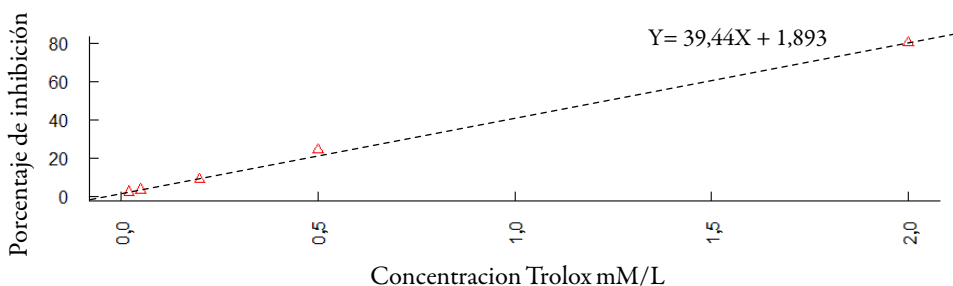


Figura 2. Curva de calibración DPPH· vs. porcentaje de inhibición.

Determinación de la actividad antioxidante de los compuestos obtenidos por MAE

Espectroscopia UV-Vis. La actividad antioxidante de los extractos obtenidos por MAE de *Vaccinium meridionale* se midió frente a los radicales libres DPPH·. La medida de la actividad antioxidante por el método permite confirmar la contribución relativa de los diferentes compuestos presentes en el fruto estudiado. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método y de acuerdo con el diseño experimental utilizado en la investigación.

Tabla 5. Resultados codificados del diseño 2^3 por DPPH.

| Ensayo | (A) | (B) | (C) | TEAC (mg/g) |
|--------|-----|-----|-----|-------------|
| 1 | - | - | - | 1,78 |
| 2 | + | - | - | 2,78 |
| 3 | - | + | - | 2,82 |
| 4 | + | + | - | 4,65 |
| 5 | - | - | + | 2,97 |
| 6 | + | - | + | 4,79 |
| 7 | - | + | + | 4,55 |
| 8 | + | + | + | 5,74 |

Análisis del modelo de regresión codificado para el diseño factorial 2^3 , de primer orden, en la extracción de antioxidantes de frutos de *vaccinium meridionale*, según las variables consideradas

El objetivo del análisis de regresión es modelar de manera matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes. Los datos codificados a partir del diseño factorial 2^3 contemplan el número de tratamientos entre las combinaciones de las variables independientes codificadas como temperatura (A), tiempo (B) y % de EtOH (C) tabla (2). La respuesta como TEAC mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con un ($p < 0,001$). Según el análisis de regresión codificado de la tabla 6, las variables A y C tienen un mayor efecto en el sistema, generando una mejora en la respuesta TEAC. Se observa que el único factor que no tiene un efecto significativo es B ya que su P-value es el único que se acerca a 0,001 [13, 25].

Se observa en la figura 3 que el modelo no es lineal y q hay una tendencia en los datos diferente a cero. La gráfica de distribución (normal Q-Q) muestra que el modelo no tiene comportamiento normal ya que todos los valores de TEAC no tienen un comportamiento lineal. Por ello, se realiza el análisis de residuales, comprobando que no hay evidencia para creer que los residuos no siguen la distribución normal. Los resultados obtenidos se llevaron a una gráfica de efectos (ver figura 4) que muestra la magnitud de la influencia de cada factor presente en el estudio, observando que no todos los factores son significativos ya que sus efectos son iguales [26], por tanto es necesario ajustar el modelo a un modelo lineal con interacciones y variables reales para determinar los factores de importancia en los niveles de estudio alto y bajo con los valores reales del diseño experimental planteado en la investigación [13, 18, 27].

El modelo lineal sin interacciones no es estadísticamente significativo para la variable de respuesta TEAC. Se puede observar en la tabla 6, que si bien en la ecuación (1) el valor del error aleatorio es diferente de cero y que el valor $R^2 = 0,977$, con R^2 ajustado = 0,9598, el modelo matemático no se ajusta en su totalidad a los valores experimentales de la investigación [28]. De esta forma, el modelo obtenido con un ajuste lineal, que considera los efectos y las interacciones significativas en el desempeño del método está enunciado en la ecuación (3) [13, 29].

Tabla 6. Análisis del modelo de regresión codificado. Fórmula TEAC = A + B + C.

| | Error estándar estimado | Error del modelo | t value | Pr(> t) |
|------------|-------------------------|------------------|---------|------------|
| Intercepto | 1,5975 | 0,1916 | 8,340 | 0,00113 ** |
| A | 1,4600 | 0,1916 | 7,622 | 0,00159 ** |
| B | 1,3600 | 0,1916 | 7,100 | 0,00208 ** |
| C | 1,5050 | 0,1916 | 7,857 | 0,00142 ** |

Códigos nivel significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 ' ' Error residual del modelo: 0,2709 en 4 grados de libertad (DF), R2: 0,977, R² ajustada: 0,9598 F-estadística: 56,77 en 3 y 4 DF p-value: 0,0009807.

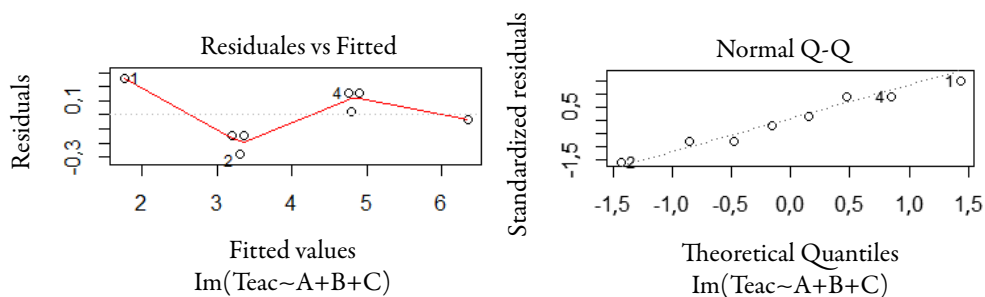


Figura 3. Probabilidad normal de los efectos codificados sin interacciones.

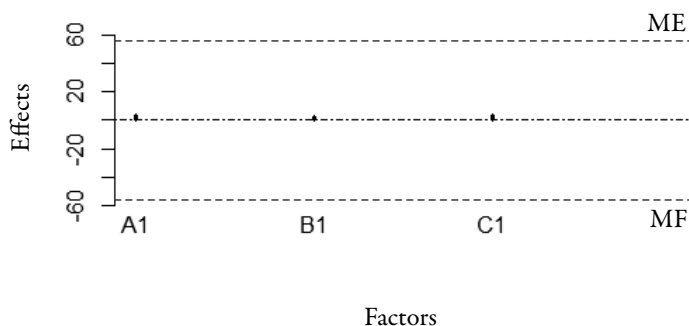


Figura 4. Gráfico de probabilidad normal de los efectos.

Desarrollo de la ecuación (3) utilizando variables codificadas, para el nivel alto.

$$Y = \beta^{\circ} + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \varepsilon(\pm) \quad \text{Ecuación (3)}$$

$$Y = 1,5975 + 1,4600A_1 + 1,3500B_2 + 1,5050C_3$$

$$Y = 5,9125$$

Determinación de la actividad antioxidante de los compuestos obtenidos por MAE (variables originales)

En la tabla 7 se observan los resultados del diseño experimental 2^3 con las variables originales que se utilizaron en el procedimiento analítico llevado a cabo en el equipo de MAE.

Tabla 7. Resultados variables originales del diseño 2^3 por DPPH.

| Ensayo | Temperatura (K) | Tiempo (min) | Etanol (% EtOH) | TEAC (mg/g) |
|--------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|
| 1 | 343,15 | 5 | 0 | 1,78 |
| 2 | 383,15 | 5 | 0 | 2,78 |
| 3 | 343,15 | 15 | 0 | 2,82 |
| 4 | 383,15 | 15 | 0 | 4,65 |
| 5 | 343,15 | 5 | 80 | 2,97 |
| 6 | 383,15 | 5 | 80 | 4,79 |
| 7 | 343,15 | 15 | 80 | 4,55 |
| 8 | 383,15 | 15 | 80 | 5,74 |

TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox (mg/g fruto seco).

Análisis del modelo de regresión del diseño factorial 2^3 de primer orden con interacciones (variables reales)

Actividad antioxidante TEAC. El análisis de regresión demostró que el modelo es altamente significativo como se puede observar en la tabla 8 y que, además, es evidente a partir del test de Fisher ($F_{\text{modelo}} = 7$) con un muy bajo valor de probabilidad ($P_{\text{modelo}} > 0,000$) [30]. El valor del coeficiente de determinación ajustada (R^2_{ajustada}) es de 1, estadística que ofrece cierto indicio de la capacidad predictiva del modelo de regresión de la ecuación (5) que no presenta error aleatorio (ε), como se puede observar en la tabla 9 y en el desarrollo de la ecuación (5) utilizando variables reales, para el nivel bajo y alto [31].

En cuanto el resultado del análisis experimental y el valor predicho por el modelo matemático de primer orden con interacciones se ajusta el modelo un nivel de confianza del 100% como se observa en la tabla 9, de otro lado, la figura 4 muestra que las variables que tienen un efecto más significativo son el tiempo y el %EtOH. Estos resultados son comparables a los reportados por otros autores, cuyo objetivo era extraer por MAE polifenoles de especies vegetales como Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [32].

Es necesario realizar un análisis de los mecanismos de reacción de la forma como cada una de estas variables se comportan en relación con los sistemas solvente-variables físicas, y su efecto significativo en procesos de extracción asistida por microondas (MAE) de frutos de la especie *Vaccinium meridionale*, para determinar actividad antioxidante por el método DPPH· sobre la variable de respuesta en TEAC [13, 28].

Tabla 8. Análisis de regresión unidades originales con interacciones: fórmula TEAC= temperatura * tiempo * %EtOH.

| | Error estándar estimado | Error del modelo | t value | Pr(> t) |
|--------------------------|-------------------------|------------------|---------|----------|
| Intercepto | - 3,759 | NA | NA | NA |
| Temperatura | 0,01463 | NA | NA | NA |
| Tiempo | -0,608 | NA | NA | NA |
| %EtOH | -0,1547 | NA | NA | NA |
| Temperatura* tiempo | 0,002075 | NA | NA | NA |
| Temperatura* %EtOH | 0,0004844 | NA | NA | NA |
| Tiempo*%EtOH | 0,01633 | NA | NA | NA |
| Temperatura*tiempo*%EtOH | 0,00004563 | NA | NA | NA |

(NA): no aplica error residual del modelo: NA en 0 grados de libertad (DF), R2: 1, R2 ajustada: NA F-estadística: NA, en 7 y 0 DF p-value: NA.

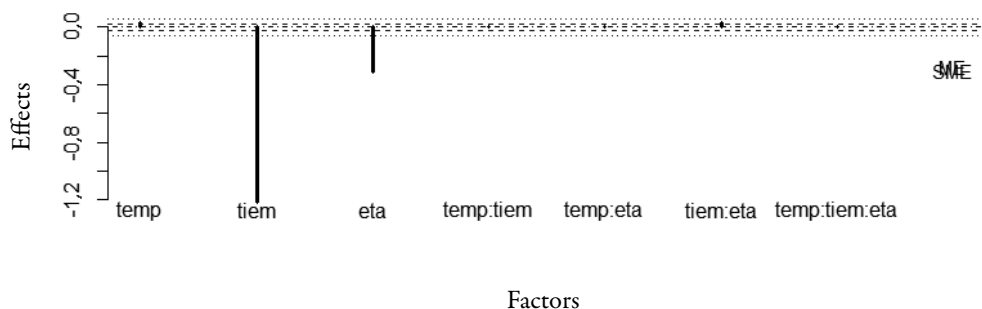


Figura 5. Grafica de efectos temperatura (temp) * tiempo (tiem) *%EtOH (eta).

Desarrollo de la ecuación (4) utilizando variables reales, para el nivel bajo y alto.

$$y = \beta^0 + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{12} A_1 B_2 + \beta_{13} A_1 C_3 + \beta_{14} B_2 C_3 + \text{Ecuación (4)}$$

$$\beta_{15} A_1 B_2 C_3 + \varepsilon(\pm)$$

Nivel bajo: $Y = -3,759 + 0,01463(343,15) - 0,608(5) - 0,1547(0) + 0,002075(343,15*5) + 0,0004844(343,15*0) + 0,01633(5*0) - 0,00004563(343,15*5*0)$
 $Y = -3,759 + 5,020 - 3,040 - 0 + 3,560 + 0 + 0 - 0$
 $Y = 1,781$

Nivel alto: $Y = -3,759 + 0,01463(383,15) - 0,608(15) - 0,1547(80) + 0,002075(383,15*15) + 0,0004844(383,15*80) + 0,01633(15*80) - 0,00004563(383,15*15*80)$
 $Y = -3,759 + 5,605 - 9,120 - 12,376 + 11,925 + 14,847 + 19,596 - 20,979$
 $Y = 5,740$

Tabla 9. Resultados obtenidos del diseño factorial 2³ y predicción del modelo para actividad antioxidante sobre la variable de respuesta en TEAC.

| Obser | Temperatura (K) | Tiempo (min) | %etanol (%EtOH) | TEAC (mg/g) | Ecuación 5 ajustada | $\varepsilon(\pm)$ |
|-------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 343,15 | 5 | 0 | 1,78 | 1,78 | 0,00 |
| 2 | 383,15 | 5 | 0 | 2,78 | 2,78 | 0,00 |
| 3 | 343,15 | 15 | 0 | 2,82 | 2,82 | 0,00 |
| 4 | 383,15 | 15 | 0 | 4,65 | 4,65 | 0,00 |
| 5 | 343,15 | 5 | 80 | 2,97 | 2,97 | 0,00 |
| 6 | 383,15 | 5 | 80 | 4,79 | 4,79 | 0,00 |
| 7 | 343,15 | 15 | 80 | 4,55 | 4,55 | 0,00 |
| 8 | 383,15 | 15 | 80 | 5,74 | 5,74 | 0,00 |

TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox (mg/g fruto seco).

Etanol y tiempo

El coeficiente de correlación, R, mide la intensidad de la relación lineal entre las variables y varía entre -1 y 1, si R fue próximo a -1 indica que existió una fuerte relación lineal negativa entre las variables, señalando una disminución de TEAC al aumentar el tiempo de calentamiento o almacenamiento; si fue próximo a 0, no hubo correlación lineal; y si fue próximo a +1, hubo una fuerte relación lineal positiva entre las variables,

por lo que un aumento del tiempo y la concentración de etanol, implicaría un aumento de la TEAC [13, 29].

Análisis de regresión unidades originales interacción tiempo%EtOH*

La finalidad del modelo de la ecuación 4 es reproducir el comportamiento de las variables tiempo* %etanol. El modelo de primer orden con interacciones muestra que estas variables son las que tienen mayor importancia con respecto a la variable dependiente TEAC lo cual, a partir del análisis de regresión de la tabla 10, indica que el modelo R² es de 64% de la variabilidad en la respuesta del porcentaje de extracción de compuestos con propiedades antioxidantes, mientras que el R² ajustado es de 37%, lo que indica que las variables son altamente significativas.

Tabla 10. Análisis de regresión unidades originales interacción tiempo* %etanol. Fórmula = TEAC ~ tiempo *% etanol.

| | Error estándar estimado | Error del modelo | t value | Pr(> t) |
|----------------|-------------------------|------------------|---------|----------|
| Intercepto | 1,5525000 | 1,1909424 | 1,304 | 0,262 |
| Tiempo | 0,1455000 | 0,1065211 | 1,366 | 0,244 |
| %etanol | 0,0211875 | 0,0210531 | 1,006 | 0,371 |
| Tiempo*%etanol | -0,0002375 | 0,0018830 | -0,126 | 0,906 |

Error residual del modelo: 1,065 en 4 grados de libertad (DF), R2: 0,645, R² ajustada: 0,3788F-estadística: 2,423, en 3 y 4 DF p-value: 0,2061.

Los p-value obtenidos para las variables: tiempo (p<0,244), %EtOH (p<0,375) y la interacción tiempo*%etanol (p<0,906) muestran que el tiempo es la variable que tiene mayor influencia en la respuesta TEAC seguido del %EtOH. La influencia en la respuesta del sistema ante cambios en las variables puede ser observada claramente en la siguiente figura:

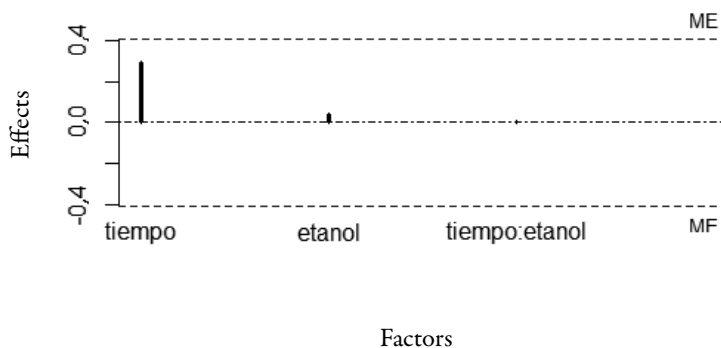


Figura 6. Gráfica de efectos tiempo*%EtOH.

Se desarrolló la ecuación 5 para las variables que tienen un efecto más significativo, para el nivel bajo y alto.

$$Y = \beta^{\circ} + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{14} B_2 C_3 + \varepsilon(\pm) \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$\begin{aligned} \text{Nivel bajo } Y &= 1,5525 + 0,1455 (5) + 0,02118 (0) + \\ &-0,0002375 (5*0) \quad Y = 1,5525 + 0,727 + 0 + 0 \quad Y = 2,28 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Nivel alto } Y &= 1,5525 + 0,1455 (15) + 0,02118 (80) + \\ &-0,0002375 (15*80) \quad Y = 1,5525 + 2,1825 + 1,694 - 0,028 \quad Y = 5,401 \end{aligned}$$

Se observa que el impacto de la interacción de los factores tiempo y %EtOH es altamente positiva para el sistema, aumentando considerablemente el desempeño de procesos de MAE en frutos de la especie *Vaccinium meridionale*, para determinar actividad antioxidante por el método DPPH· sobre la variable de respuesta en TEAC.

Tiempo vs. %etanol

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta figura 7 y el análisis de contornos de la figura 8, de un modelo de primer orden con interacciones, indica que el comportamiento de las variables tiempo y etanol es directamente proporcional en el proceso, demostrando que estas son las variables con mayor un efecto sobre a la variable de respuesta, y en menor medida la temperatura ya que en el nivel bajo se tiene una respuesta de 2,8 TEAC y a medida que aumenta el tiempo y el %EtOH la variable de respuesta aumenta hasta 5,4 TEAC aportando cerca del 64% de eficiencia en la extracción [13, 31].

La superficie de respuesta obtenida muestra que el método propuesto para la extracción de antioxidantes de la especie *Vaccinium meridionale* no tiene un desplazamiento hacia puntos máximos o mínimos de las variables que intervienen en el proceso; por lo tanto, es posible observar que el comportamiento del método es directamente proporcional a los cambios en las variables.

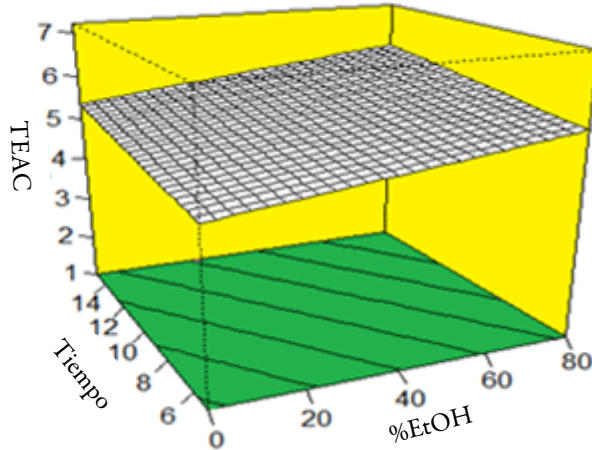


Figura 7. Gráfica de superficie de respuesta efecto del tiempo (min)* %EtOH sobre la extracción de antioxidantes.

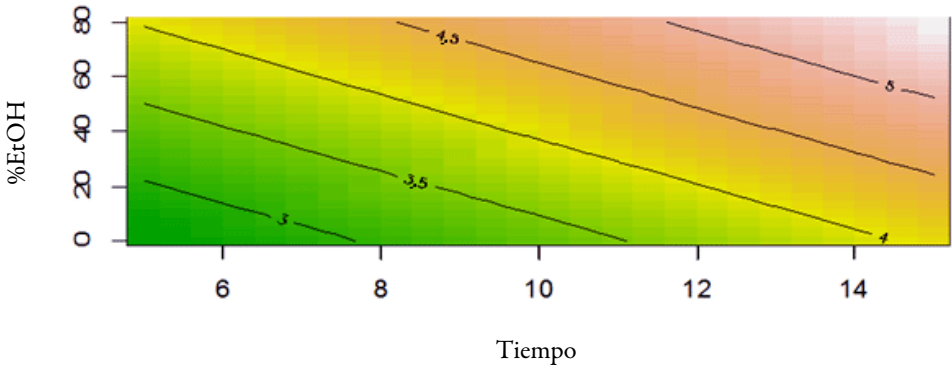


Figura 8. Gráfica de contornos efecto del tiempo (min)* %EtOH sobre la extracción de antioxidantes.

CONCLUSIONES

En comparación con los métodos convencionales empleados para la extracción de compuestos con actividad antioxidante, presentes en frutas, el método de extracción asistida por microondas ofrece una alternativa con mayores atractivos en términos del ahorro energético, la reducción considerable de disolventes que pueden afectar las con-

diciones medioambientales y unos tiempos significativamente menores de proceso, que redundan de modo definitivo en la eficiencia del proceso.

La aplicación de un diseño factorial 2³ en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale* Swartz demuestra que, en términos de diseño y modelamiento, puede ofrecer alternativas con resultados comparables con la aplicación de otros diseños estadísticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos, de Facultad de Ciencias de la Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia (UPTC).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. N. Socorro, K. Arévalo, M. Verde, C. Rivas, M. Araday, M. Nuñez, M. Morales, Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schtdl (zarzamora), *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **43**, 66-71 (2011).
2. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **160**(1), 1-40 (2006).
3. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**(1), 44-84 (2007).
4. E. Viado-Pupo, L. Gómez-Robles, I. Campana-Marrero, Estrés oxidativo, *Correo Científico Médico*, **21**(1), 171-186 (2017).
5. F. Chamorro, G. Nates, Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (*Ericaceae*) en los Andes orientales de Colombia, *Revista de Biología Tropical*, **63**(4), 1197-1212 (2015).

6. Y. Franco, B. Rojano, A. Alzate, D. Morales, M. Maldonado, Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y anti-proliferativa de néctar de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **66**(4), 261-271 (2016).
7. C. Gaviria-Montoya, J.D. Hernandez-Arredondo, M. Lobo-Arias, C.I. Medina-Cano, B.A. Rojano, Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración, *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin*, **65**(1), 6487-6495 (2012).
8. G. Garzón, C. Narváez, K. Riedl, S. Schwartz, Chemical composition , anthocyanins , non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia, *Food Chem.*, **122**, 980-986 (2015).
9. M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis*, **27**, 259-271 (1999).
10. M. Gallo, R. Ferracane, G. Graziani, A. Ritieni, V. Fogliano, Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices, *Molecules*, **15**(9), 6365-6374 (2010).
11. Z. Liu, J. Wang, P. Shen, C. Wang, Y. Shen, Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from *Radix Angelicae sinensis*, *Separation and Purification Technology*, **52**(1), 18-21 (2006).
12. B. Nayak, F. Dahmoune, K. Moussi, H. Remini, S. Dairi, O. Aoun, M. Khodir, Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels, *Food Chemistry*, **187**, 507-516 (2015).
13. D.C. Montgomery, *Diseño y análisis de experimentos*, 2ª ed., Limusa-Wiley, México, 2005, p. 170-301.
14. W.E. Espinosa-Manrique, L.C.A. Garzon-Salcedo, O.J. Medina-Vargas, Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana *Vaccinium meridionale*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(1), 109-126 (2016).
15. L.M. Zapata, A.M. Heredia, C.F. Quinteros, A.D. Malleret, G. Clemente, J.A. Cárcel, Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, **25**(49), 166-192 (2014).

16. W.E. Espinosa, L.C.A. Garzón, O.J. Medina, Microwave-assisted extraction in dry fruit of andean species *Vaccinium meridionale*: Experimental conditions on the recovery of total polyphenols, *Ciência e Agrotecnologia*, **41**(6), 701-712 (2017).
17. R. Ramesh, R.J. Shakila, B. Sivaraman, P. Ganesan, P. Velayutham, Optimization of the gelatinization conditions to improve the expansion and crispiness of fish crackers using RSM, *LWT-Food Science and Technology*, **89**, 248-254 (2018).
18. J. Song, D. Li, C. Liu, Y. Zhang, Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **12**, 282-287 (2011).
19. E. Marta-Kuskoski, A. Garcia-Asuero, A.M. Troncoso, J. Mancini-Filho, R. Fett, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, **25**, 726-732 (2005).
20. A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S.I. Koo, O.K. Chun, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**(7), 1043-1048 (2011).
21. L.J. Bernal-Rueda, *Evaluación de las propiedades bioactivas de mora (Rubus glaucus) y agraz (Vaccinium meridionale Swartz), en fresco y durante procesos de transformación*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, 2012, p. 48-80 .
22. S.S. Kashyap, P.R. Gogate, S.M. Joshi, Ultrasound assisted synthesis of biodiesel from karanja oil by interesterification : Intensification studies and optimization using RSM, *Ultrasonics Sonochemistry*, **50**, 36-45 (2019).
23. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, **28**(1), 25-30 (1995).
24. D.-O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. Lee, Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(13), 3713-3717 (2002).
25. R. Tabarak, A. Nateghi, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**(6), 1279-1286 (2011).

26. S. Sahin, O. Aybaster, E. Isik, Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, *Food Chem.*, **141**, 1361-1368 (2013).
27. M. Gamboa, F. Viquez, E. Cubero, Utilización del método de superficie de respuesta para formular una base de banano (*Musa AAA*) para batidos, *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **1**(1), 81-94 (2014).
28. I.E. Garofulić, V. Dragović-Uzelac, A.R. Jambrak, M. Jukić, The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca), *Journal of Food Engineering*, **117**(4), 437-442 (2013).
29. G. Cano, J. Velasquez, V. Fierro, Evaluación de los efectos producidos por la temperatura y la relación agente activante/carbón en la preparación de carbones activados para almacenamiento de hidrógeno, *Revista Investigaciones Aplicadas*, **2**(1), 15-21 (2008).
30. I. Miller, J. Freund, R. Johnson, *Probabilidad y Estadística Para Ingenieros*, 4ª ed., Prentice-Hall Hispanoamericana S.A, México, 2000, p. 160-488.
31. A. Arteaga, H. Arteaga, Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides, *Scientia Agropecuaria*, **7**, 191-200 (2016).
32. J. Švarc-Gajic, Z. Stojanovic, A. Segura-Carretero, D. Arráez-Román, I. Borrás, I. Vasiljevic, Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*, *Journal of Food Engineering*, **119**(3), 525-532 (2013).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

W. Ávila-Ávila, O.J. Medina-Vargas, L.M. Moreno-Bastidas, Aplicación de un diseño factorial 2³ en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 643-661 (2019).

A descrição teórica da detecção eletroanalítica do letrozol, assistida pelo composto VO(OH)-polipirrol, obtido catodicamente

Volodymyr V. Tkach*^{1,2}, Marta V. Kushnir¹, Nataliia M. Storoshchuk¹, Sílvio C. de Oliveira², Olga V. Luganska³, Vira V. Kopyika³, Hélder Briosos e Gala⁴, Ali Baddouh⁵, Petro I. Yagodnyets¹

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

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

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

⁴Action4Touch, ActionB4Touch, Rua das Sudas, Bl. 1, R/C. Esq., 3770-067, Oia, Aveiro, Portugal.

⁵Universidade Ibn Zohr, Departamento de Química, Cidade Universitaria, 80000, Aghadir, Sous, Reino de Marrocos.

*Correo electrónico: nightwatcher2401@gmail.com

Recebido em: 21 de abril de 2018

Aceito em: 19 de setembro de 2019

RESUMO

O processo da determinação eletroanalítica do fármaco letrozol, assistida pelo composto VO(OH)-polipirrol, obtido mediante um processo catódico, foi descrito teoricamente. Tanto para a síntese do composto, como para o processo eletroanalítico foi sugerido e analisado, mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações, um modelo matemático. Foi mostrado que, ao contrário da eletrossíntese de polipirrol catódica, iniciada por um composto na solução, o polipirrol resultante tem uma morfologia mais “centrada” aos centros ativos da matriz, dopados pelos cátions VO₂⁺. No entanto, tanto a síntese do composto, como o seu desempenho eletroanalítico com o letrozol podem ser considerados eficientes.

Palabras clave: letrozol, elétrodos quimicamente modificados, polipirrol, oxihidróxido de vanádio, estado estacionário estável.

SUMMARY

Theoretical description for the letrozol electroanalytical determination, assisted by the cathodically obtained composite VO(OH)-polypyrrole

The process of the electroanalytical determination of letrozol drug, assisted by the cathodically obtained VO(OH)-Polypyrrole, has been theoretically described. For both the composite synthesis and electroanalytical function a mathematical model has been suggested and analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. It was shown that, contrarily to the cathodic polypyrrole electrosynthesis, initiated by a compound in a solution, the resulting cathodic polypyrrole has more “centred” morphology, in the relation to the matrix active centers, doped by VO₂⁺ cations. Nevertheless, either the synthesis of the composite, or its electroanalytical function with letrozole may be considered efficient.

Key words: letrozol, chemically modified electrodes, polypyrrole, vanadium oxyhydroxide, stable steady-state.

INTRODUÇÃO

Letrozol, isto é 4-4'-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metileno)dibenzonitrila, número CAS 112809-51-5, masa molar 285,303 g/mol (figura 1) é um composto inibidor de aromatasas, usado para tratamento de diferentes tipos de câncer do pulmão [1-4]. Do ponto de vista químico, é um derivado triazólico, que contém dois grupos nitrila:

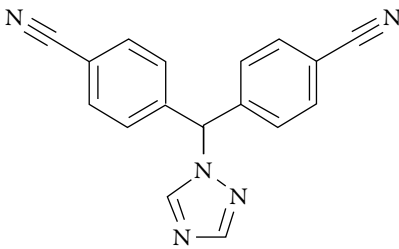


Figura 1. Letrozol.

Além do seu uso no tratamento de câncer, o letrozol é amplamente usado, também, no tratamento de infertilidade como estimulador ovariano [5, 6] até por ter menos efeitos colaterais que clomifeno e, outrossim, por dar menos chances de gestação múltipla. Sem embargo, além da sua ação direta, o fármaco possui diferentes efeitos colaterais [7-10], como artralgia e fadigas. O seu uso excessivo em mulheres pode provocar a

síndrome de hiperestimulação ovariana [9, 10]. Ademais, o seu uso duradouro e excessivo pode provocar osteoporose [11]. Destarte, o desenvolvimento de métodos da sua determinação é, deveras, uma tarefa atual [12-14], e o desenvolvimento de métodos eletroquímicos servir-lhe-iam de boa solução.

Existem trabalhos, em que o letrozol tem sido determinado eletroquimicamente [15-19]. O processo eletroanalítico estava sendo realizado mediante a redução catódica dos grupos nitrile laterais.

Um dos modificadores de eléctrodo, capazes de ser usados na detecção eletroanalítica do letrozol pode ser polipirrol, que é um dos polímeros condutores mais usados nas cinco últimas décadas. Ele foi o primeiro polímero condutor, que veio a ser sintetizado química [20], e eletroquimicamente [21] e até agora ele e seus compósitos são amplamente usados na eletroanalítica como modificadores de eléctrodos, agindo como substâncias ativas e(ou) mediadores de transferência de elétrons.

O desempenho do polipirrol ter-se-ia feito mais eficaz, se este fosse combinado com o oxihidróxido de vanádio (VO(OH)), um composto com comportamento eletroquímico flexível, mas mais acentuado para as propriedades redutoras [21]. No entretanto, por ora, nenhum trabalho acerca da modificação do eléctrodo por VO (OH) para fins eletroanalíticos tem sido publicado (à exceção de alguns trabalhos teóricos do nosso grupo [22, 23], num dos quais foi comprovada a sua eficácia justamente com o letrozol [23]), e a introdução de um novo modificador de eléctrodo pode acarretar os problemas como:

- Dependência entre a maneira de sintetizar o compósito e as suas propriedades (isto se refere não só à questão eletroanalítica em particular, senão às propriedades químicas em geral, bem como ao estado físico, em que o compósito está presente no eléctrodo).
- A indecisão acerca do mecanismo mais eficiente-tanto da síntese do compósito (qual técnica é mais eficaz para o material ser utilizado em sensores-síntese eletroquímica ou química; e se for eletroquímica, se é codeposição anódica com polimerização direta, ou catódica, com a indireta?), como das questões comportamentais.
- A possibilidade das instabilidades eletroquímicas, características não só para a eletrosíntese e desempenho eletroanalítico dos polímeros condutores [24-26], como para a obtenção do oxihidróxido de cobalto [27-29], que é composto relacionado.

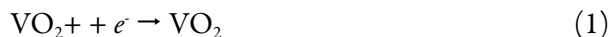
Para a resolução destes problemas na etapa do desenvolvimento da metodologia de produção do sensor e do seu desempenho, uma análise teórica *a priori* do comportamento de ambos os processos faz-se necessária-não só para compreender melhor os processos que ocorrem no sistema eletroanalítico, mas também para fazer o eléctrodo

resultante mais eficaz. Outrossim, mediante esta avaliação far-se-á possível comparar o comportamento do processo de eletrossíntese e detecção eletroanalítica do letrozol com os análogos.

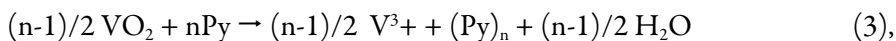
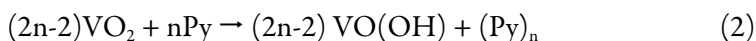
Destarte, o objetivo geral deste trabalho é avaliar, mecanisticamente, o comportamento dos sistemas da preparação e desempenho do sensor, baseado no compósito de polipirrol com o oxihidróxido de vanádio, obtido, mediante uma metodologia de eletrodeposição catódica. Na primeira seção do presente trabalho, analisa-se o processo da eletrossíntese do compósito, e na segunda, analisar-se-á o desempenho do compósito.

SEÇÃO I. A ELETROSSÍNTESE

A eletrossíntese do compósito de polipirrol far-se-ia por uma técnica, parecida com a usada pelo grupo de pesquisadores sul-coreanos em [29], mas com o composto iniciador inserto na matriz, que cobre o cátodo. Na etapa inicial, o íon pervanadilo VO_2^+ é catodicamente reduzido, para formar o dióxido, conforme (1):

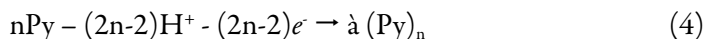


De fato, a depender do pH da solução e da concentração do monômero, existem dois cenários da polimerização do pirrol, que se divergem apenas pela forma, em que o vanádio trivalente aparece na superfície do cátodo:



podendo, inté, dar origem a um compósito ternário.

Tem-se em conta, também, a equação geral da polimerização do pirrol:



Destarte, para descrever o sistema da eletrossíntese do compósito polipirrol-oxihidróxido de vanádio, por via catódica, considerando que, no início da reação, todos os sítios ativos do cátodo são ocupados pelo íon VO_2^+ , introduzimos duas variáveis:

c : a concentração do monomer na camada pré-superficial

v : o grau do recobrimento da superfície pelo dióxido de vanádio.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente, o que nos deixa menosprezar o fluxo de convecção. Outrossim, supomos que o eletrólito de suporte esteja em excesso, o que nos deixa menosprezar o fluxo de migração. Ademais, considera-se que o perfil concentracional na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ .

É possível mostrar que o comportamento do sistema da eletrossíntese se pode descrever conforme o conjunto de equações diferenciais bivalente (5):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (c_0 - c) - r_2 - r_3 \right) \\ \frac{dv}{dt} = \frac{1}{G} (r_1 - r_2 - r_3) \end{array} \right. \quad (6)$$

sendo c_0 a concentração do pirrol no interior da solução, Δ o seu coeficiente de difusão, G a concentração máxima do dióxido de vanádio e os parâmetros r , as velocidades das respectivas reações, que se podem calcular conforme (7-9):

$$r_1 = k_1 (1 - v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (7)$$

$$r_2 = k_2 v^n c^{2n-2} \exp(-\alpha v) \quad (8)$$

$$r_3 = k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v) \quad (9)$$

sendo os parâmetros k as constantes das respectivas reações, α , o parâmetro, que relaciona o comportamento da dupla camada elétrica (DCE), com o grau do recobrimento do dióxido de vanádio, F é o número do Faraday, φ_0 é o salto do potencial na DCE, relativo ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases e T é a temperatura absoluta no sistema.

Neste caso, a eletrossíntese do composto de polipirrol terá o comportamento mais dinâmico que nós já descritos [29, 30] processos catódicos, mas, por não haver instabilidades superficiais, menos dinâmica que durante a polimerização anódica direta [31]. As diferenças comportamentais entre esses processos descrever-se-ão abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO I)

Para investigar o comportamento do sistema com a eletrodeposição do composto de polipirrol com os compostos de vanádio trivalente, analisamos o conjunto de equações diferenciais (6), haja vista as relações algébricas (7-9), mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações. Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi podem ser descritos como:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \quad (10)$$

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - (2n-2)k_2 v^n c^{2n-1} \exp(-\alpha v) - (2n-2)k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-1} \exp(-\alpha v) \right) \quad (11)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} \left(-nk_2 v^{n-1} c^{2n-1} \exp(-\alpha v) + \alpha k_2 v^n c^{2n-1} \exp(-\alpha v) - \frac{n-1}{2} k_3 v^{\frac{n-3}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v) + \alpha k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v) \right) \quad (12)$$

$$a_{21} = \frac{1}{G} \left(-(2n-2)k_2 v^n c^{2n-1} \exp(-\alpha v) - (2n-2)k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-1} \exp(-\alpha v) \right) \quad (13)$$

$$a_{22} = \frac{1}{G} \left(-k_1 \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + \alpha k_1 (1-v) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - nk_2 v^{n-1} c^{2n-1} \exp(-\alpha v) + \alpha k_2 v^n c^{2n-1} \exp(-\alpha v) - \frac{n-1}{2} k_3 v^{\frac{n-3}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v) + \alpha k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v) \right) \quad (14)$$

As condições principais dos pontos singulares para sistemas bivariantes são reunidas na tabela 1:

Tabela 1. As principais condições para sistemas bivariantes.

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Estabilidade do estado estacionário | Tr J < 0, Det J > 0 |
| Comportamento oscilatório | Tr J = 0, Det J > 0 |
| Instabilidade monotônica | Tr J < 0, Det J = 0 |

Para evitar as expressões grandes durante a análise da matriz, nós introduzimos as novas variáveis, de modo que os elementos da matriz se descrevem como:

$$\frac{2}{\delta G} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - W & -L \\ -W & -V - L \end{vmatrix} \quad (15)$$

Observando as expressões (11) e (14), pode-se ver que o *comportamento oscilatório* neste sistema é mais provável que no caso da presença do iniciador na solução [28, 29], mas menos prováveis que durante a eletropolimerização direta [30, 31], visto que a DCE é influenciada por mais de um processo, mas a instabilidade superficial é ausente.

Além das influências, que a DCE sofre durante a etapa eletroquímica (que produz o iniciador do crescimento do polímero), descritas pela positividade de $\alpha k_3 (1 - \mu) \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right)$, o comportamento oscilatório pode, também, ser causado pelas influências da iniciação, que leva à aparição do composto de vanádio trivalente e radical-cátion do polipirrol. Essas influências são descritas pela positividade dos elementos $\alpha k_2 v^n c^{2n-1} \exp(-\alpha v)$ e $k_3 v^{\frac{n-1}{2}} c^{2n-2} \exp(-\alpha v)$.

A condição de *estabilidade do estado estacionário*, para este sistema pode ser descrita conforme: $\text{Tr } J < 0$, $\text{Det } J > 0$ (vide a tabela 1). Abrindo os parênteses, obtê-la-emos conforme:

$$\begin{cases} -\kappa - W - V - L < 0 \\ \kappa V + \kappa L + VL > 0 \end{cases} \quad (15)$$

E esta condição é satisfeita de forma garantida, no caso da possibilidade dos parâmetros V e L , que descrevem a fraqueza das influências na DCE da formação do iniciador e da iniciação do crescimento da cadeia. O processo da eletrossíntese é controlado pela difusão do monômero, e a morfologia polimérica será menos desenvolvida que em [28, 29], sendo mais centrada aos sítios ativos de VO_2^+ , posteriormente transformado em VO_2 e $\text{VO}(\text{OH})$, na superfície, mas mais desenvolvida que em [30, 31], por a eletrodeposição anódica do polímero condutor sofrer influências das instabilidades superficiais.

A *instabilidade monotônica*, neste sistema, é possível, contrariamente ao caso, descrito em [28]. Isto é causado pela igualdade entre as influências estabilizadoras e desestabilizadoras na DCE. A sua condição para a eletrossíntese do composto pode ser descrita como:

$$\begin{cases} -\kappa - \Xi - \Omega - \Lambda < 0 \\ \kappa\Omega + \kappa\Lambda + \Xi\Lambda = 0 \end{cases} \quad (16)$$

CONCLUSÕES (SEÇÃO I)

Da análise da eletrossíntese teórica do composto de polipirrol com os compostos do vanádio trivalente, principalmente, com o seu oxihidróxido VO(OH), é possível concluir que:

- A deposição catódica é realizada de forma eficiente, mas a morfologia do polímero resultante diferir-se-á tanto da obtida durante a codeposição anódica, como durante a deposição catódica com o iniciador na superfície.
- O processo da eletrossíntese é controlado pela difusão, e o estado estacionário estável é fácil de obter e manter.
- Contrariamente ao caso da presença do iniciador do crescimento da cadeia polimérica na solução, neste caso as instabilidades eletroquímicas são possíveis, sendo causadas única e exclusivamente pelas influências dos processos da eletrorredução e da iniciação nas capacitâncias da DCE.

SEÇÃO II. DESEMPENHO

Como o letrozol contém os dois grupos nitrila, a sua detecção eletroquímica sobre o composto polipirrol-VO(OH) dar-se-á conforme:

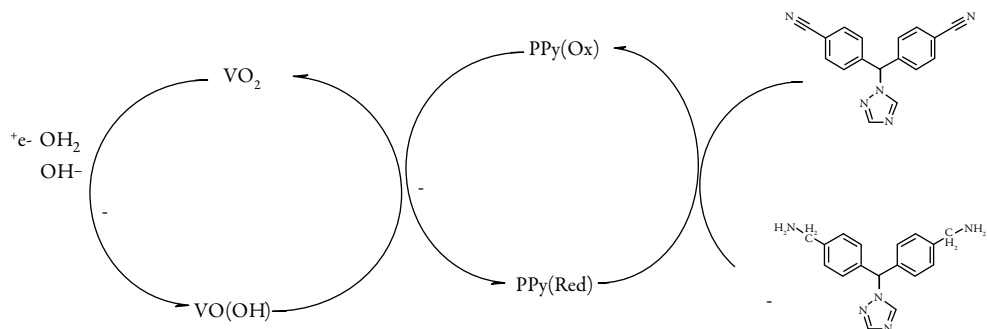


Figura 2. Detecção eletroquímica do letrozol.

A redução eletroquímica far-se-á, prioritariamente, pelos grupos nitrila. No caso da aplicação dos potenciais catódicos mais baixos, o anel triazólico também será reduzido.

Neste caso, o polímero condutor age como substância ativa, e o oxihidróxido de vanádio, como mediador. O polímero condutor, além de reforçar o desempenho do VO(OH), aumenta a sua estabilidade face os meios ácidos.

Destarte, para descrever o desempenho deste compósito, supondo o suposto na seção anterior, introduzimos as três variáveis:

l : a concentração do letrozol na camada pré-superficial

p : o grau do recobrimento da superfície pelo polímero condutor

V : o grau do recobrimento da superfície pelo dióxido de vanádio.

As equações de balanço, no modelo mais geral, incluirão, também a redução do anel triazólico e descrever-se-ão como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dl}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{D}{\delta} (l_0 - l) - r_4 - r_5 \right) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{P} (r_4 + r_5 - r_6) \\ \frac{dV}{dt} = \frac{1}{V} (r_6 - r_7) \end{array} \right. \quad (17)$$

Sendo as velocidades das respectivas reações:

$$r_4 = k_4 c (1 - \theta) \quad (18)$$

$$r_5 = k_5 c (1 - \theta) \quad (19)$$

$$r_6 = k_6 \theta (1 - V) \quad (20)$$

$$r_7 = k_7 V \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (21)$$

Sendo os significados dos parâmetros análogos aos descritos na seção anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEÇÃO II)

Os membros estacionários da matriz de Jacobi para o sistema com o desempenho do compósito polipirrol-VO(OH) na detecção eletroanalítica de letrozol podem ser descritos como:

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

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{D}{\delta} - k_4(1-\theta) - k_5(1-\theta) \right) \quad (23)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (k_4c - k_5c) \quad (24)$$

$$a_{13} = 0 \quad (25)$$

$$a_{21} = \frac{1}{P} (k_4(1-\theta) + k_5(1-\theta)) \quad (26)$$

$$a_{22} = \frac{1}{P} (-k_4c - k_5c - k_6(1-V)) \quad (27)$$

$$a_{23} = \frac{1}{P} (k_6\theta) \quad (28)$$

$$a_{31} = 0 \quad (29)$$

$$a_{32} = \frac{1}{V} (k_6(1-V)) \quad (30)$$

$$a_{33} = \frac{1}{V} \left(-k_6\theta - k_7 \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - qk_7V \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (31)$$

Aplicando o mesmo procedimento da seção anterior, observamos que o comportamento oscilatório neste sistema é possível; como nos sistemas análogos [32-35], ele é causado apenas pelas influências da etapa eletroquímica na dupla camada elétrica.

Para investigar a estabilidade do estado estacionário, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (17) o critério Routh-Hurwitz. Evitando as expressões grandes, introduzimos as novas variáveis, reescrevendo o determinante do jacobiano conforme:

$$\frac{2}{\delta PV} \begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & \Omega & 0 \\ \Xi & -\Omega - \Lambda & P \\ 0 & \Lambda & -P - \Delta \end{vmatrix} \quad (32)$$

Aplicando a condição $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário como:

$$(-\kappa_1 - \Xi)(\Omega P + \Omega \Delta + \Lambda \Delta) + \Omega P \Xi + \Omega \Delta \Xi < 0 \quad (33),$$

que se rearranja para:

$$(-\kappa_1)(\Omega P + \Omega \Delta + \Lambda \Delta) - \Xi \Lambda \Delta < 0 \quad (34),$$

e que é garantidamente satisfeito no caso da ausência ou fraqueza das influências da etapa eletroquímica na dupla camada elétrica. Deveras, no caso da satisfação da exigência supracitada, o parâmetro Δ terá valores positivos, e a expressão do lado esquerdo da inequação (34) desviar-se-á para valores mais negativos, o que é correspondente à estabilização do estado estacionário.

Do ponto de vista eletroanalítico, a estabilidade do estado estacionário é correspondente à dependência linear entre a concentração do analito (letrozol) e o parâmetro eletroquímico (neste caso, a corrente). Por isso, é possível concluir que o sistema eletroanalítico é eficiente. O processo eletroanalítico é controlado pela difusão.

A instabilidade monotônica, correspondente ao limite de detecção do ponto de vista eletroanalítico, também é possível para este sistema, e as suas condições descrevem-se como:

$$(-\kappa_1)(\Omega P + \Omega \Delta + \Lambda \Delta) - \Xi \Lambda \Delta = 0 \quad (35)$$

CONCLUSÕES (SEÇÃO II)

A investigação mecanística teórica do sistema da eletrorredução da letrozol, assistida pelo composto de VO(OH) com o polipirrol deixou concluir que:

- O oxihidróxido de vanádio trivalente pode ser usado como um perfeito modificador de eléctrodo para a quantificação de letrozol em meios neutro, leve e moderadamente ácido.
- O estado estacionário no sistema é fácil de obter e manter. A estabilidade do estado estacionário só pode ser atrapalhada por impactos da reação eletroquímica na DCE, que causam o comportamento oscilatório.

- A zona topológica da estabilidade do estado estacionário é muito vasta e a dependência linear entre o parâmetro eletroquímico e a concentração mantém-se facilmente.

- O comportamento oscilatório neste sistema é possível, mas menos provável que nos semelhantes, haja vista a ausência das instabilidades superficiais. Ele pode ter como única causa as influências da reação eletroquímica nas capacitâncias da DCE.

Do ponto de vista geral, ambos os sistemas se apresentam eficientes. Assim, do ponto de vista teórico existe pretexto forte de uso destes dois processos não só para a determinação do letrozol, mas também para outros fármacos com grupos aceptadores de elétrons.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. A. Bhatangar, Review of the development of letrozole and its use in advanced breast cancer and in the neoadjuvant setting, *Breast*, **15**, 3-13 (2006).
2. D.-X Xe, X. Ma, Clinical utility of letrozole in the treatment of breast cancer: a Chinese perspective, *Onco Targets Ther.*, **9**, 1077-1075 (2016).
3. A. Balakrishnan, D. Ravichandran, Early operable breast cancer in elderly women treated with an aromatase inhibitor letrozole as sole therapy, *Brit. J. Cancer*, **105**, 1825-1829 (2011).
4. Ch. Ketkaew, N. Kiatying-Angsulee, Drug use evaluation of letrozole in breast cancer patients at regional cancer hospitals in Thailand, *Asian Pac. J. Canc. Prev.*, **16**, 6055-6059 (2015).
5. J. Kim, A. Steiner, M. Fritz *et al.*, Severe ovarian hyperstimulation syndrome after letrozole-gonadotropin stimulation: a case report, *J. Assist. Reprod. Gen.*, **29**, 127-129 (2011).
6. Q. Mai, X. Hu, G. Yang *et al.*, Effect of letrozole on moderate and severe early-onset ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk women: a prospective randomized trial, *Am. J. Obst. Gynec.*, **42**, 1-42 (2017).

7. J. Younus, L. Kligman, Management of aromatase inhibitor-induced arthralgia, *Curr. Oncol.*, **17**, 87-90 (2010).
8. J. Bauml, L. Chen, J. Chen *et al.*, Arthralgia among women taking aromatase inhibitors: is there a shared inflammatory mechanism with co-morbid fatigue and insomnia?, *Breast Canc. Res.*, **17**, 89 (2015).
9. K. Desai, J. Mao, I. Sue *et al.*, Arthralgia among women taking aromatase inhibitors: is there a shared inflammatory mechanism with co-morbid fatigue and insomnia?, *Supp. Care Cancer*, **1**, 43-51 (2013).
10. Q. He, L. Liang, C. Zhang *et al.*, Effects of different doses of letrozole on the incidence of early-onset ovarian hyperstimulation syndrome after oocyte retrieval, *Syst. Biol. Reprod. Med.*, **60**, 355-360 (2014).
11. M. Ganesh, K. Rajasekar, M. Bhagiyalakshmi *et al.*, Determination of letrozole in tablet formulations by reversed phase high performance liquid chromatography, *Trop J. Pharm. Res.*, **9**, 505-510 (2010).
12. A. Rusu, M.-A. Sbanca, N. Todoran, C.E. Vari, Letrozole determination by capillary zone electrophoresis and UV spectrophotometry methods, *Acta Med. Marisiensis*, **63**, 80-86 (2017).
13. B.A. Moussa, R.I. El-Bagary, E.E.A. Osman, Determination of letrozole in pharmaceutical preparation and human plasma based on fluorometric detection, *Anal. Chem. Lett.*, **3**, 139-146 (2013).
14. M. Annapurna, S. Pratyusha, R. Naik, New RP-HPLC method for the quantification of letrozole (an anti-cancer agent), *Acta Sci. Pharm. Sci.*, **3**, 106-109 (2019).
15. A. Sharma, K. Jhankal, D. Sharma, Electrochemical determination of letrozole in pharmaceutical formulations by advanced voltammetric techniques, *Chem. Sci. Trans.*, **6**, 69-76 (2017).
16. M.R. Ganjali, A. Karimi, P. Norouzi, Letrozole potentiometric PVC membrane and nano-composite carbon paste electrodes, *Int J. Electrochem. Sci.*, **7**, 3681-3692 (2012).
17. M. Aydın, B. Yilmaz, E. Alcın *et al.*, Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats, *Neuroscience*, **151**, 186-194 (2008).

18. Y.B.A. Jacob, J. Jeyasundari, Interaction of anticancer drug letrozole with Ds-DNA analyzed by electrochemical methods, *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **3**, 221 (2015).
19. A. Angeli, L. Alessandri, Sopra il nero del pirrolo. Nota preliminare, *Gazz. Chim. Ital.*, **279**, 46 (1916).
20. http://acshist.scs.illinois.edu/bulletin_open_access/v40-1/v40-1%20p45-55.pdf, acesso aos 19 de setembro de 2019
21. Y. Cui, Y. Xue, R. Zhang *et al.*, Vanadium-cobalt oxyhydroxide shows ultralow overpotential for the oxygen evolution reaction, *J. Mater. Chem. A*, **7**, 21911-21917 (2019).
22. V.V. Tkach, N.M. Storoshchuk, M.V. Kushnir *et al.*, Descrição teórica do uso do oxihidróxido de vanádio para a detecção eletroanalítica de nitrito (em ucraniano), *Act. Probl. Biol. Ecol. Chem.*, **15**, 127-132 (2018).
23. V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, S.M. Lukanova *et al.*, The theoretical description for the use of the vanadium (III) oxyhydroxide for letrozol electrochemical determination, *Appl. J. Env. Eng. Sci.*, **4**, 33-39 (2018).
24. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting, Abstract # 2240, <http://ma.ecsdl.org/content/MA2010-02/38/2240.full.pdf>, acesso aos 8 de agosto de 2015.
25. O. Stadnik, *Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt*, Diss. Kand. Chim. N.-Kyiv, 2011.
26. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Met.*, **130**, 73-83 (2002).
27. 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).
28. V.M de Andrade, *Confeção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol*, Tés. M. Eng., UFRGS., Porto Alegre, 2006.
29. Y. Jung, N. Singh, K.-Sh. Choi, Cathodic deposition of polypyrrole enabling the one-step assembly of metal-polymer hybrid electrodes, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 8331-8334 (2009).

30. V.V. Tkach, R. Ojani, V.V. Nechyporuk *et al.*, Cathodic and anodic potentiostatic polypyrrole electrodeposition in strongly acid media. Theoretical and experimental comparison, *Bulg. Chem. Commun.*, **48**, 126-133 (2016).
31. A.S. Liu, M.A.S. Oliveira, Electrodeposition of polypyrrole films on aluminum from tartrate aqueous solution, *J. Braz. Chem Soc.*, **18**, 143-153 (2007).
32. 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).
33. V.V. Tkach, V.V. Nechyporuk, P.I. Yagodynets', The mathematical stability study of the work of isomerization sensors, based on conduction polymers, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, **6**, 273-283 (2014).
34. V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, Y.G. Ivanushko *et al.*, Estudo de estabilidade da eletrossíntese e do desempenho eletroanalítico do composto poli(l-metionina)-nano-Au na presença de dopamina e de ácido úrico, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**, 385-421 (2016).
35. V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, R. Ojani *et al.*, A eletrorredução de benzodiazepinas e a sua avaliação matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím., Farm.*, **45**, 362-373 (2016).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, N.M. Storoshchuk, S.C. de Oliveira, O.V. Luganska, V.V. Kopiika, H. Brios e Gala⁴, A. Baddouh, P.I. Yagodynets', A descrição teórica da detecção eletroanalítica do letrozol, assistida pelo composto VO(OH)-polipirrol, obtido catodicamente, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 662-676 (2019).

Development of a new Colombian product, effective for the treatment of carious lesions: a case study

Milton Enrique Londoño-Lemos*, Ocar Bustamante

Centro Colombiano de Investigación en Ciencias Básicas y Médicas, CCICBM de la Fundación Científica Siete (Fundación c7), Bogotá D.C., Colombia 11131.

*E-mail: info@fundacionc7.com

Received: February 26, 2019

Accepted: September 27, 2019

SUMMARY

Purpose: We present a new Colombian product researched and developed by Seven Scientific Foundation, which has been very useful for the removal of the carious tissue in patients who have used this innovative product.

Methods: We used a chemical-mechanical removal of dental caries. This product is made with 10% papain which is the active principle and works as a debriding agent, as well as being a bacteriostatic, bactericidal and anti-inflammatory agent; and also contain dragon's blood (*Croton lechleri*) sap which is an effective as analgesic/anti-inflammatory and especially as a healing agent. In this article, we present a case study of a patient, whose dental carious tissue was removed, using the dental new product. **Description of the case report:** in this article, we present a case study of a patient, whose dental carious tissue has been removed, using the new dental product, therefore this innovative technique of removal of the atraumatic carious tissue. **Conclusions:** This method is useful as it is a minimally invasive technique, without requiring the use of local anesthesia, or the additional use of dental instruments. It is used in the Colombian population of all ages and does not generate side effects in people who have used it so far.

Key words: Research and development, papain, dragon's blood, chemical-mechanical removal, carious tissue, atraumatic restoration, bactericidal, bacteriostatic and anti-inflammatory activity.

RESUMEN

Desarrollo de un nuevo producto colombiano, efectivo para el tratamiento de las lesiones cariosas: un caso de estudio

Propósito: se investigó y desarrolló un nuevo producto dental el cual ha sido muy útil para la remoción del tejido carioso en los pacientes colombianos que han utilizado este innovador producto para la remoción químico-mecánica de las caries dentales. **Métodos:** este producto está hecho a base de papaína al 10 % el cual es el principio activo y funciona como un agente debridante lo cual cicatriza el tejido removido, además de ser un agente bacteriostático, bactericida y antiinflamatorio. **Descripción de reporte de caso:** en este artículo se presenta un estudio de caso de un paciente al cual se le removió el tejido carioso dental. **Conclusiones:** por lo tanto, esta técnica innovadora de remoción del tejido carioso atraumático resulta útil por ser una técnica mínimamente invasiva, sin requerir el uso de anestesia local al tejido afectado ni el uso adicional de instrumentos dentales. Se utiliza en la población colombiana de todas las edades y no genera efectos colaterales en las personas que lo han utilizado hasta el momento.

Palabras clave: Investigación y desarrollo, papaína, sangre de drago, remoción químico-mecánica, tejido carioso, restauración atraumática, actividad bactericida, bacteriostática y antiinflamatoria.

INTRODUCTION

Contextualization of carious lesions

Dental caries is an important oral health problem in most industrialized countries, affecting 60-90% of schoolchildren and the vast majority of adults. The earliest manifestation of the decay process is a small patch of demineralized (smoothed) enamel on the surface of the tooth, often hidden from view in the fissures (grooves) of the teeth or between the interproximal surfaces. The destruction extends to the softer part. The weakened enamel collapses to form a cavity and the tooth is progressively destroyed. Cavities can also attack the roots of the teeth if they are exposed by the gum recession of the gums. This is more common in older adults.

Dental caries caused by the action of acids on the surface of the enamel. The acid is produced when sugars (mainly sucrose) in foods or beverages react with bacteria present in the dental biofilm (plaque) on the surface of the tooth. The acid produced leads to a loss of calcium and phosphate from the enamel; this process is called demineralization. The main treatment option for a dental cavity is to perforate caries and place a

restoration made of several materials (e.g., composite resins, and other filling materials). Extensive tooth decay may require a crown, root canal treatment or even tooth extraction [1].

Therefore, since 1975 the chemical and mechanical removal of caries was introduced, countless studies have been carried out including a recent study showing the usefulness of papain [2]. Therefore, this article aims to show the development of an innovative chemical formulation for the Atraumatic Restorative Treatment (ART) of the carious lesions carried out in a Clinical Dentist located at Bogotá DC-Colombia.

THEORETICAL BASIS

Types of cavities

Dr. G.V. Black (1836-1915) developed a system to classify carious lesions according to the type of tooth affected (anterior or posterior tooth) and the location of the lesion (for example, lingual, buccal, occlusal, etc.). The six kinds of carious lesions are.

Class I: Cavity in pits or fissures in the occlusal surfaces of molars and premolars; Facial and lingual surfaces of the molars; Lingual surfaces of the maxillary incisors (Class I corresponds to the surfaces of a posterior tooth that can be seen clinically: occlusal/lingual/ buccal surfaces, therefore, the interproximal surfaces are not classified as Class I).

Class II: a cavity in the proximal surfaces of the premolars and molars (class II corresponds to the surfaces of a posterior tooth that cannot be seen clinically).

Class III: Cavity in the proximal surfaces of the incisors and canines that do not involve the incisal angle (Class III corresponds to the surfaces of an anterior tooth that cannot be seen clinically).

Class IV: Cavity in the proximal surfaces of the incisors or canines that affect the incisal angle (the Class IV lesion is the largest version of Class III that covers the incisal angle).

Class V: Cavity in the cervical third of the facial or lingual surfaces of any tooth (think of the neck of the tooth).

Class VI: Cavity in the incisal edges of the anterior teeth and tips of the cusp of the posterior teeth (Class VI corresponds to the upper surface of a tooth) [3].







| Classes | Illustration |
|-----------|--|
| Class I |  |
| Class II |  |
| Class III |  |
| Class IV |  |
| Class V |  |
| Class VI |  |

Figure 1. Types of Carious Lesions. Modified from Jeong *et al.* [3].

Classification of caries according to its severity

The appearance of interproximal caries can be classified as incipient, moderate, advanced or severe, depending on the amount of enamel and dentin involved in the caries process.

Incipient: a lesion that extends less than half of the enamel.

Moderate: a lesion that extends more than half of the enamel, but does not involve the dentin-enamel junction (DEJ).

Advanced: an injury that extends to or through the DEJ but does not extend more than half the distance to the pulp.

Severe: an injury that extends through the enamel, dentin and more than half the distance to the pulp.

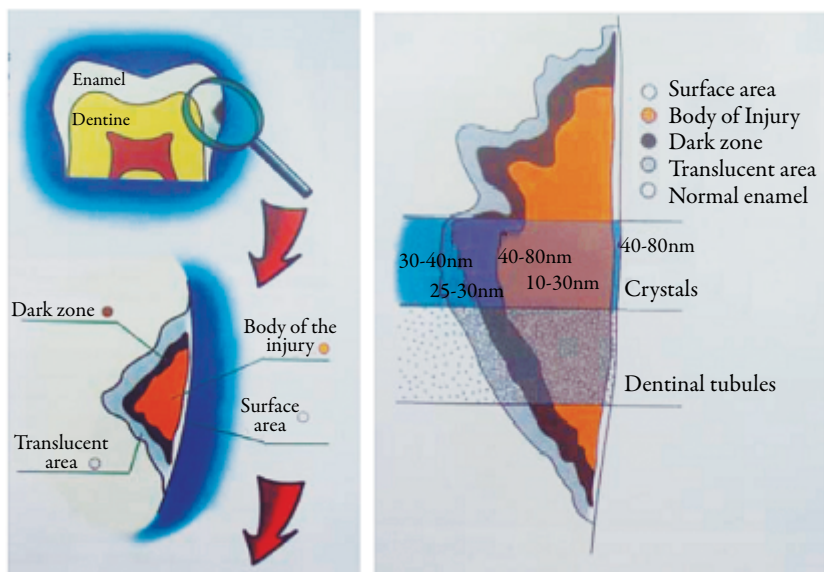
The above can be seen in the following figure:

| Stages | Illustration | Radiographs |
|-----------|--------------|-------------|
| Incipient | | |
| Moderate | | |
| Advanced | | |
| Severe | | |

Figure 2. The severity of the Carious Lesions. Modified from Jeong *et al.* [3].

Caries removal techniques

Dental caries is an infectious microbiological disease of the teeth that results in localized dissolution and destruction of calcified tissues (figures 3 and 4).



Figures 3-4. Dental caries covers and infect four surfaces; these are the outer layer, the translucent zone, the opaque zone, the area of the body of the lesion, which we will enunciate respectively. Modified from Hinestroza *et al.* [4].

Dental caries can be controlled by what is known as “non-invasive” methods, which include thoroughly cleaning the plaque of the teeth, recommending a healthy diet and using fluoride to prevent cavities from getting worse. If the decay progresses, it is possible that these “non-invasive” techniques should be combined with “invasive” management, which consists of removing carious tissue and restoring teeth where the cavities caused by caries impede cleaning. The dental operation will improve the appearance of the teeth and allow the patient to clean them.

Traditionally, dentists have removed all caries with a rotary instrument (burr) before placing a filling. However, the elimination of all caries has some disadvantages, which include damage to the tooth nerve, toothache and possibly weakening of the tooth structure. This method is known as complete caries removal in one-step. Despite a large amount of restorative material placed around the world on a daily basis, dentists still do not know what is the best “operational management” strategy for dental caries. Three alternative surgical interventions for the management of caries have been evaluated comparing them with the traditional treatment of removing all caries at once (removal of complete caries). These interventions were.

- Step-by-step removal: this technique eliminates caries in stages during two visits a few months apart, which allows the dental pulp to be repaired and dentine deposited.
- Partial elimination of caries: the dentist removes part of the dentinal cavity and sees what remains in the tooth permanently.
- Operative dentine is not removed - tooth decay is not removed before sealing or restoring.

It was found that when the complete caries extraction technique was compared with the stepped excavation, the pulp or nerve of the tooth would have been exposed in 347 out of every 1000 teeth treated with complete caries removal, whereas when the technique was used step excavation, this has happened in only 154 teeth per 1000.

When the technique of partial removal of caries was used, it found that the pulp or the nerve would have been exposed in 50 teeth out of every 1000 treated. However, when the complete caries removal technique was used, this figure would have been 219 teeth per 1000 treated.

There was less damage to the nerves when part of, or all of the decay was left behind, both for the baby’s teeth and for the adults. There was no difference in the number of teeth with toothache with any of the techniques. One of the dentin-free caries removal

techniques required fewer replacement fillings, although no differences were found when comparing any of the other techniques to complete tooth decay.

In the included studies, mainly specialized dentists placed the fillings and the teeth were followed for a relatively short time (1 year). More studies are needed to help answer more questions. Non-specialized dentists to verify if the results would be similar should perform future studies. These studies should follow patients for long, check if there is any difference in toothache, more cavities, and fill replacements. They should also check what techniques patients prefer and if there is a long-term difference in cost [5].

Traditional caries removal techniques generally include the use of high, low-speed hand pieces, and manual cutting instruments. The advancement of the diagnostic systems has achieved a more precise knowledge of the caries process, improved materials, cutting instruments and new removal techniques with a minimum invasive approach. A minimally invasive criterion in the treatment of caries emphasizes the conservation of healthy tooth structure and can minimize the replacement cycle of the initial restoration.

Minimally invasive dentistry

The term Minimally Invasive Dentistry (MID) can be defined as the management of caries with a biological approach instead of surgical, which is more related to traditional dentistry.

The golden triangle of the MID is constituted by:

The histology of the dental substrate that will receive treatment.

The chemistry and manipulation of the adhesive materials used to restore the cavity

The considerations of the operative techniques available for the selective elimination of caries.

This current integrates concepts of prevention, control, and treatment, including the detection of early lesions, the identification of risk factors (risk assessment) and the establishment of prevention and education strategies for the patient's health. When the effects of the disease are present, in the form of a carious lesion, therapeutic strategies with less invasive solutions are required [6].

Atraumatic restorative technique

On the other hand, and as it is normal to be in this type of techniques, we have to say that there are some cases in which its use is not recommended, especially in this case in

those patients who have pulpal problems, or in whom the Caries is not accessible with manual instruments, as well as in the case that the caries is located on the proximal surfaces of the adjacent tooth. This is a technique that stands out due to the low cost it has, and because it is a very simple and painless intervention, which is carried out under the modern concept of minimal cavitation preparation [7].

Mechanical, chemical removal

The chemical-mechanical removal of caries part of the minimally invasive dentistry stream is based on the action of a chemical agent that softens the dentin altered by the action of the carious process, denatured and infected and that is complemented with a mechanical removal by means of non-cutting manual instruments [8].

This technique has been shown to decrease the risk of pain due to the selective elimination of caries. In general, a chemical agent for the removal of caries must be able to cause a greater degradation of collagen partially degraded by the action of bacteria. This is achieved by the rupture of the non-covalent bonds of the triple helix in collagen structure, the mentioned phenomenon generates that the application of chemical agents such as caries removers does not act on the intact collagen but they dissolve only the dentin that is altered allowing the selective removal of it. More recently, proteolytic agents such as papain can be used to further degrade the partially demineralized and altered dentin matrix that has been previously exposed to bacterial action (infected dentine), which facilitates its elimination and prevents damage to the underlying remineralize tissue (affected dentin) [9].

Papain is an endoprotein similar to human pepsin, which has bactericidal, bacteriostatic and anti-inflammatory activity, from the latex of the leaves and fruits of the ripe green papaya, *Carica papaya*, cultivated in tropical countries such as Brazil, India, Ceylon, South Africa and Hawaii [10].

Papain interacts with collagen exposed by the dissolution of dentin minerals by bacteria, which makes infected dentin softer, allows its extraction by means of non-cutting instruments and dispenses, thus the use of anesthesia and rotary instruments. The degraded part of the collagen of decayed dentine is chlorinated by chloramine and is easily removed with the excavator. That is to say, that this auxiliary formulation is used to chemically soften decayed dentin, as well as, the degraded portion of the collagen of decayed dentin is colored by the solution used in the chemical and mechanical removal of caries. This coloration affects the secondary and/or quaternary structure of the collagen, breaking the hydrogen bridges and facilitating the removal of decayed tissue [11].

On the other side, Dragon's Blood is an important ethnobotanical medicine that is common in South America and Latin America. Dragon's blood has an anti-

inflammatory action due to the taspine alkaloid from the dragon's blood that was first documented in 1979. Later studies confirmed these actions, leading to further studies in the area of wound healing. In one study, Oil-based was found to be the cicatrizing active principle of an *in vivo* test in mice; increase migration of human fibroblasts was suggested as the probable mechanism in this acceleration of the wound-healing process. The most well-known source of Dragon's Blood is *Croton lechleri*, ranging primarily from the rain forests and low mountains of Colombia and Ecuador to Bolivia. *C. lechleri* resin and bark are used in traditional medicine in South America. Externally, it is employed, as a wound-healing agent. Dragon's Blood also cleans the wound by killing bacteria, microbes and other junk with its antiseptic properties, helps take the pain away, helps the wound heal faster, helps lower inflammation and stops the bleeding. Dragon's Blood may be able to help with receding gums and dental health [12].

New formulations have been introduced that add some other enzymes, for example, in Mexico, containing papain and bromelain (enzyme extracted from pineapple fruit) has been distributed since 2013, and in 2016 it was marketed in Argentina based on papain which, unlike its conventional presentation, is bio encapsulated, which gives it greater stability and increases enzymatic activity [13], in addition to other more recent products based on papain and clove oil [2].

For this reason, this article aims to address a new formulation of a dental gel for the chemical removal of dental caries based on the use of an active ingredient and a phyto-therapeutic extract: Papain and Dragon 's blood respectively.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Relative insulation: (roll cotton), small round cavity cutter, # 5 teaspoon, dental gel, final filling material: 37% orthophosphoric acid, adhesive, and resin.

Methods

Procedure in a 20-year-old patient. The procedure for tooth decay in tooth # 22. It is done by isolating the area with rolls of cotton, spoon # 5. The Gel product is applied. In pits and pigmented fissures, in carious tissue. For three minutes. The mechanical removal of the contaminated gel is carried out. Pigmented and softened tissue is observed, the Gel is applied again for two minutes, until finding no pigmented tissues. The entire gel is removed with # 5 teaspoon, water is applied under pressure, no pulpal protection is applied and it is dried with a cotton swab and dry air.

The filling process is started by placing at the marginal edges of the cavity, demineralized with orthophosphoric acid, for 10 seconds, the cavity is washed with water under pressure. It is dried with a cotton swab, proceeds to apply the Bis GMA obturation material. It is polymerized and the resinous adhesive material is applied. After the final polishing occlusion control is done.

Product development

The qualitative composition of the product

This new product developed into the Fundación Científica 7 in Bogotá-Colombia is basically made up of papain as follows:

Basic Formulation

Table 1. Ingredients with an international denomination (INCI).

| Formulation ingredient | Amount (%w/v) |
|---|---------------|
| Water | Q.S. |
| Carbomer | Q.S. |
| Triethanolamine | 0.967% |
| D-glucono-1,5 lactone (and) calcium Gluconate | 0.483% |
| Croton lechleri resin extract | Q.S. |
| Papain | Q.S. |
| Sodium benzoate | 0.483% |

*Observations on New Gel Dental Product.

Manufacturing: the formulation of the gel is conceived with the use of a carbomer and its respective stabilizer, which is triethanolamine, the set of these two, and the manufacturing protocol allows obtaining the gel cosmetic form, which is the vehicle of addition for the active principle of papain.

Quality control: tests made in bulk production and finished product correspond to physicochemical parameters (density, pH, viscosity, among others).

Actives agents

Active principle: Papain; debridant, anti-inflammatory, not damaging healthy tissue, accelerating the healing process.

Papain is a proteolytic enzyme, extracted from the latex of leaves and fruits of the adult green papaya (*Carica papaya*) (see figure 5).



Figure 5. Papain from the papaya (*Carica papaya*).

Resource: taken from Thon *et al.* [14].

At the beginning of treatment with papain, there was an increase in the local secretion, softening of the necrotic tissue, detaching the edges of the lesion and a small increase in its diameter (halo of hyperemia). After a certain time, the necrotic tissue detaches and a rapid and gradual decrease in the halo of hyperemia occurs, accelerating the healing process, thus decreasing the recovery period of the lesions in patients using the enzyme papain. It acts on the injured tissue due to the absence of a plasmatic anti-protease, α 1-antitrypsin, which prevents its proteolytic action in tissues considered normal. The α 1-anti-trypsin inhibited the digestion of proteins, therefore, as the infected tissue does not present α 1-antitrypsin, papain acts by “breaking” the collagen molecules partially degraded by the action of caries, since the It has the capacity to digest dead cells [15].

Dragon's Blood (*Croton lechleri*)

It is a tree native from Peru. The latex *Croton palanostigma* contains among its main components, an alkaloid called taspine. It also contains pyridone, aporphine, quinoline and the SP-303 principle, which is an oligomer substance with antiviral action. Dragon's blood is the name given to popularly exuding latex by tearing the bark of some tropical plant species. It is a viscous liquid, blood red, and astringent taste. It has chemical components that provide therapeutic properties against various diseases, such as diarrhea, ulcers and wound healing [16].

Previous studies have shown important chemical and pharmacological properties of the dragon's blood sap, as anti-inflammatory [17], healing [18], anticancer, antifungal, antiviral and antibacterial. In previous work, it was shown that the dragon's blood (*Croton lechleri*) at the 100% concentration had an inhibitory effect *in vitro* on *Streptococcus mutans*, producing an average inhibition halo of 11mm. Likewise, the dragon's blood at the concentration of 75% had an inhibitory effect *in vitro* less than the 100% concentration on *Streptococcus mutans* producing average inhibition halos of 8mm. This strain proved to be sensitive *in vitro* to *Croton lechleri* latex in concentrations of 75% and 100% [19]. The suggested use in Dental teets: 5 to 10 drops in a little water as a mouthwash or place directly on a toothbrush for natural toothpaste [20].

DESCRIPTION OF THE CASE REPORT

The new dental gel developed and performed at Clinical trials in patients by one of the authors (O. Bustamante) of the Scientific Foundation Seven, has been used successfully in 84 patients who presented different carious lesions. To illustrate the use of this product, a case study is shown, performed on a 20-year-old female patient who attended the dental clinic with caries disease. We searched with standardized procedures, the removal of the carious lesion.

Observed characteristics

The patient does not report pain or postoperative sensitivity in control at 8, 15, 30 days and a year. No lucid, apical radio zones are observed.

During the clinical examination, in addition to the evidence of active caries in other regions, the presence of two extensive lesions of caries on the occlusal surface of the teeth was detected.

Clinical procedure

Figure 6. Carious injury, figure 7: application of new dental gel product, figure 8: caries removal, figure 9: demineralization, figure 10: sealing with resin and polymerized polished.

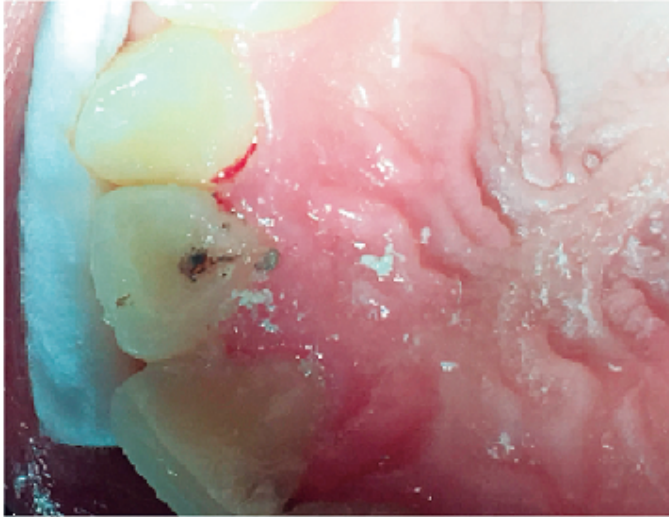


Figure 6. Carious lesion: pit and fissure in the palatal area of tooth 22 (left lateral incisor). B with a depth of the carious tissue in 1.5 mm pit.

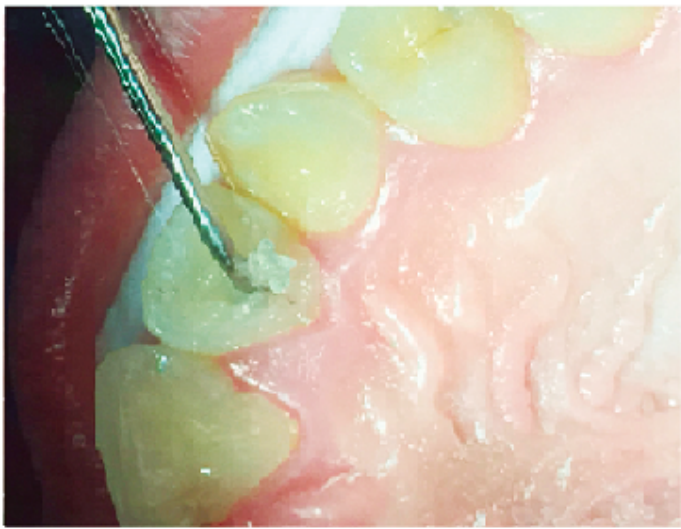


Figure 7. Application of the new dental gel: with a small round bur, an opening of 2 mm was made in distal meso direction. The gel was placed for a time of 2 mm.



Figure 8. Removal of Carious Tissue: Mechanical removal of the carious tissue proceeded. The carious tissue was cleaned. The cavity free of carious tissue was observed, profusely washed with water and air for 5 minutes.



Figure 9. Demineralization: 37% orthophosphoric acid was placed on the marginal surface of the cavity for a period of 30 seconds. It was washed profusely, dried with cotton swabs until a whitish surface was observed.



Figure 10. Sealing with resin: adhesive was applied and polymerized for 30 seconds and the final restoration material (palatal resin) was placed.

DISCUSSION

The dental clinic into the C7 Scientific Foundation is the first Colombian laboratory to innovate in the development of products for the permanent treatment and removal of dental caries in the Colombian population. Based on the research and development generated so far, we have worked with this product. The label contains the following information for patients who require this product:

New Dental Gel Product

Oral gel with papain and Dragon's blood is a product for the hygiene and care of teeth and gums

How to use: Apply on teeth and gums, leave on for 5 minutes and rinse

Precautions: Recommended for children over two years, with adult supervision, do not expose to high temperatures. Keep in a cool and dry place. Keep out of reach of children. If you observe an adverse reaction, discontinue use and consult your dentist.

This new dental product is made of papain, which is an endoprotein present in the latex of the leaves and fruits green or ripe, of the *Carica papaya*, is interesting because it is similar to the human pepsin that has antibacterial, bacteriostatic and anti-inflammatory activity, accelerating the healing process once the decay in the affected area is removed [21].

To ensure that papain has a complete antibacterial, bacteriostatic and anti-inflammatory pharmacological activity, the maximum permitted the concentration of papain, i.e. 10%, should be used.

This innovative product also contains Dragon's Blood that is shown that can help protect and even heal teeth from cavities [22]. It is also interesting to note that it is used in the treatment of Gums with infected cavity [23].

These treatments combining dragon's blood with papain actives, resulting in an analgesic/ fast anti-inflammatory effect and in addition to these effects we observe the removal of dental caries, disappearance of edema, bleeding and gingival redness [24, 25] and figure 11.

This is a report that mentions that the dragon's blood supports collagen formation and exhibit wound healing and anti-inflammatory effects. In fact, the dragon's blood preserved the membrane of all cells and the functional viability of periodontal ligament cells [22].

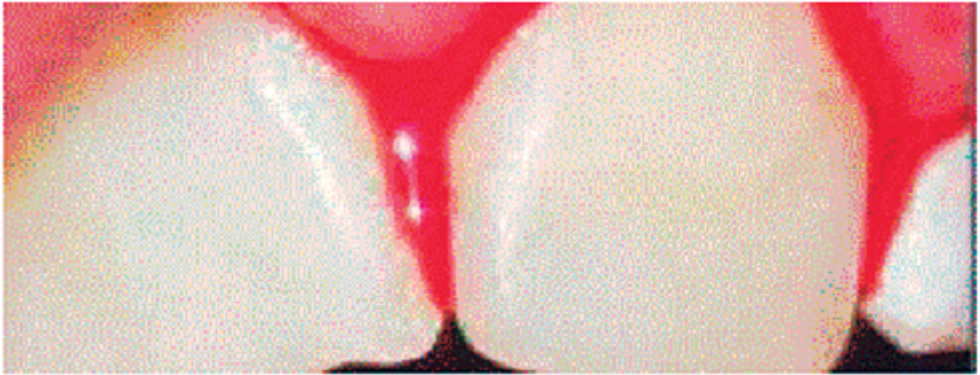


Figure 11. Use of Dragon's Blood on infected gums.

Source: Modified from Aparicio-Cortéz [23].

This is a report that mentions that the dragon's blood supports collagen formation and exhibit wound healing and anti-inflammatory effects. In fact, the dragon's blood preserved the membrane of all cells and the functional viability of periodontal ligament cells [22].

In comparison to the first formulations developed, does not contain chloramine because it has been shown over time and with the use of papain that it also has bacteriostatic and bactericidal properties inhibiting the growth of gram-positive and gram-negative organisms [26], and for which it serves to chemically soften decayed dentin.

It should be remembered that this innovative procedure is called the procedure called Atraumatic Restorative Treatment (ART) is based on excavating and eliminating tooth decay using only manual instruments, and then sealing it, looking for a form that would not be painful for tooth removal. It is interesting this procedure used mechanical chemical removal uses an enzyme (proteolytic, bactericidal, anti-inflammatory), or papain, which removes irreversibly carious tissue without action on healthy dentine (selectivity). This action complements the ART technique, giving it optimal efficacy. It can also be used in the entire population to be selected, in addition to promoting chemical debridement, granulation, and epithelialization, which accelerates the healing phases.

This mechanical, chemical method avoids the use of rotary instruments with strawberries and the application of local anesthesia are considered critical procedures, since they can cause fear and anxiety due to unpleasant experiences associated with the use of the needle and fear of the unknown [27, 28], with the advantage of a better acceptance for the treatment of the patient.

The importance of working with papain lies in the elimination of carious dentin present in cavitated carious lesions without pulp involvement. It is very innovative this method is performed without the use of anesthesia and without complaint of pain, promoting the patient a positive dental experience with minimal intervention and maximum preservation of healthy tooth structure.

The papain acts only in the injured tissue since it does not possess the plasmatic anti-protease, alpha1-antitrypsin, responsible for the digestion of proteins in healthy tissues. In damaged tissues, papain acts by “breaking” collagen fibers partially degraded by the action of caries, as it has the ability to digest dead cells. Similarly, the beneficial effect of dragon’s blood on wound healing was observed. The beneficial effect of the dragon’s blood on wound healing was observed. This is due to Taspine (as we mention in the theoretical basis, figure 12) that is an alkaloid which is described as the active ingredient in dragon’s blood [29].

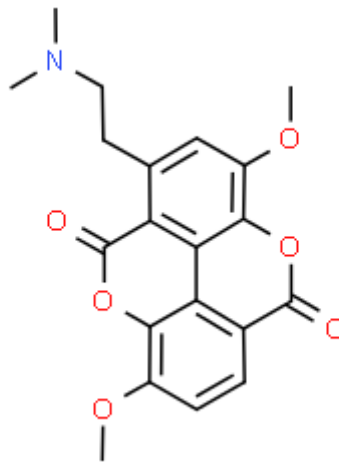


Figure 12. Chemical structure of Taspine.

Source: taken from Royal Society of Chemistry [30].

Which has been seen in rats and humans when applied in a cream formulation [31]. Dragon’s blood stimulated the contraction of the wound, the formation of new collagen and the regeneration of the epithelial layer [32]. For the expertise collected so far, it is recommended to apply the product on the decayed dentin, inside the cavity, for 60 seconds. After that period, the gel does not change color or texture, which is evident, is the agglutination of the decayed tissue. The main characteristic of the complete elimination of the infected dentinal tissue is the vitreous appearance of the cavity that appears after applying the gel. After this phase, the cavity should be washed and

dried and the restorative technique monitored. If the decayed tissue has not been completely removed, the product must be reapplied until the cavity presents this vitreous appearance. After this phase, the cavity should be washed and dried and the restorative technique monitored.

This new dental product has many positive characteristics in addition to those mentioned above such as practicality and ease of use. On the other hand, it must be taken into account that the surface of the tooth is in a dynamic equilibrium with the surrounding environment. As the pH falls below a critical value, demineralization of the enamel, dentin or cement occurs, while a mineral gain (re-mineralization) occurs as the pH increases [33].

CONCLUSIONS

We developed an innovative chemical formulation for the Atraumatic Restorative Treatment (ART) of the carious lesions, which is an excellent option for the minimally invasive removal of caries tissue. Achieving a significant reduction of the residual cariogenic bacteria of *Streptococcus mutans*, among others, in dentin and occurs in the entire population exposed to this dental condition. This is due to the debriding action of papain that has a bactericidal and anti-inflammatory bacteriostatic activity, which is achieved with Dragon's blood in the formulation developed for removing the carious tissue that is achieved without promoting any type of stimulation or pressure in the affected area.

Note: For the structuring of this manuscript, the article called: *How to write a patient case report* by Cohen [34] was taken into account.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank C7 Foundation for the realization and development of this research article.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors reported no potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Dental Health Foundation, *Dental Caries (Tooth Decay)*, Dublin 2, Ireland, 2008.
2. Kale Rupali Captain Khushali, Shirolkar Satish, Formulation optimization and performance evaluation of papain and clove oil based chemo-mechanical caries removing gel, *J. Young Pharmacists*, **10**(1), 24-26 (2018).
3. C. Jeong, D. Jeong, Must-know classifications of dental caries for the national dental hygiene boards, *Dentistry IQ*, 2016. URL: <https://www.dentistryiq.com/dental-hygiene/student-hygiene/article/16352162/mustknow-classifications-of-dental-caries-for-the-national-dental-hygiene-boards>
4. G. Hinostroza-Haro, *Diagnóstico de caries dental*, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Estomatología “Roberto Beltrán Neira”, 2007.
5. D. Ricketts, T. Lamont, N.P. Innes, E. Kidd, J.E Clarkson, Operative caries management in adults and children, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **28**(3), CD003808 (2013).
6. J. D. Featherstone, S. Domejean, Minimal intervention dentistry: Part 1. From ‘compulsive’ restorative dentistry to rational therapeutic strategies, *Br. Dent. J.*, **213**(9), 441-445 (2012).
7. D. Vieira-Pereira, Solucionando la caries dental con la Técnica Restaurativa Atraumática, *Artículos sobre Odontología general*, Barcelona, 2015, URL: <https://www.propdental.es/blog/odontologia/solucionando-la-caries-dental-con-la-tecnica-restaurativa-atraumatica/>
8. J.A. Beeley, H.K. Yip, A.G. Stevenson, Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments, *Br. Dent. J.*, **188**(8), 427-430 (2000).
9. A. Banerjee, T.F. Watson, E.A. Kidd, Dentine caries excavation: A review of current clinical techniques, *Br. Dent. J.*, **188**(9), 476-482 (2000).
10. L.C. Candido, *Tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas*, Feridólogo-Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Tratamento de Feridas Ltda, São Paulo, 2008.
11. G.M. Maragakis, P. Hahn, E. Hellwig, Clinical evaluation of chemomechanical caries removal in primary molars and its acceptance by patients, *Caries Res.*, **35**(3), 205-210 (2001).

12. *Dragon's Blood, Sangre de Drago*, Rocket Robin.ca, Inc., 2017.
13. A. Rojas de León, J. A. Rivera-Gonzaga, J. E. Zamarripa-Calderón, C. E. Cuevas-Suárez, C. Balderas-Delgadillo, C. Álvarez-Gayosso, Odontología mínimamente invasiva: Una alternativa para el tratamiento de la caries dental, *Educación y Salud Boletín Científico de Ciencias de la Salud del ICSa*, **5**(10) (2017), URL: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icsa/n10/e7.html>
14. M. Thon, T. Hosoi, K. Ozawa, Possible integrative actions of leptin and insulin signaling in the hypothalamus targeting energy homeostasis, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **7**, 138 (2016).
15. A. Juntavee, J. Peerapattana, A. Ratanathongkam, N. Nualkaew, S. Chatchiwattana, P. Treesuwan, The antibacterial effects of Apacaries gel on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study, *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.*, **7**(2), 77-81 (2014).
16. J.L. Lazo Chambilla, M.C. Pareja-Vásquez, Extracto de *Croton lechleri* y de *Pelargonium robertianum* L. en el tratamiento de la gingivitis asociada al embarazo, *Kiru*, **4**(2), 52-59 (2007).
17. R. Vila, E. Risco, A. Henriques, S. Cañigüeral, Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago, *Revista de Fitoterapia*, **5**(2), 101-114 (2005).
18. Z.P. Chen, Y. Cai, J.D. Phillipson, Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood, *Planta Med.*, **60**(6), 541-545 (1994).
19. A.M. Espinosa-Martínez, *Efecto inhibitorio de la sangre de drago (Croton lechleri) a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis: estudio microbiológico in vitro*, trabajo de grado, Universidad Internacional del Ecuador, Quito/Uide/2018, Quito, Ecuador, 2018.
20. Self-help Health, *Wellness family summit & quest for the cures continues*, 2014.
21. A. Aparecida-Pereira, I. de Carvalho-Freitas, S.M. Souza de Mendonça, A utilização do gel de papaína na remoção de lesões cariosas dentinárias, *Rev. Odontol. Uni. Cid (São Paulo)*, **25**(1), 68-76 (2013).
22. C. Men-Martins, E. Ferreira-Hamanaka, T. Yumi-Hoshida, A.M. Sell, M. Marubayashi-Hidalgo, C. Soares-Silveira, W.R. Poi, Dragon's blood sap (*Croton Lechleri*) as storage medium for avulsed teeth: *In vitro* study of cell viability, *Braz. Dental J.*, **27**(6), 751-756 (2016).

23. R. Aparicio-Cortéz, J. Mita-Sanguenza, J.A. Orko-Peñarrieta, Efectos de la sangre de drago sobre enfermedades oportunistas en pacientes del programa ITS VIH sida Santa Cruz, *Universidad, Ciencia y Sociedad*, **15**, 11-14 (2015).
24. Y.S. Li, J.X. Wang, M.M. Jia, M. Liu, X.J. Li, H.B. Tang, Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats, *J. Pharmacol. Sci.*, **118**(1), 43-54 (2012).
25. F. Namjoyan, F. Kiashi, Z.B. Moosavi, F. Saffari, B.S. Makhmalzadeh, Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *J. Tradit. Complement. Med.*, **6**(1), 37-40 (2016).
26. G. Dawkins, H. Hewitt, Y. Wint, P.C. Obiefuna, B. Wint, Antibacterial effects of Carica papaya fruit on common wound organisms, *West Indian Med. J.*, **52**(4), 290-292 (2003).
27. V.P. Maru, A. Kumar, B.K. Badiyani, A.R. Sharma, J. Sharma, C.V. Dobariya, Behavioral changes in preschoolers treated with/without rotary instruments, *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, **4**(2), 77-81 (2014).
28. H. Marques-Honório, D. Rios, E. Bresciani, V. Thiemy-Sakai, M.A.A. Moreira-Machado, Aspectos clínicos da utilização do gel de papaína e cloramina na remoção da cárie dentária, *Revista da Faculdade de Odontologia. UPF*, **14**(1), 61-65 (2009).
29. Y. Rolland, *Naturals – Return of the dragon*, Naturex, France, 2011.
30. Taspine, Royal Society of Chemistry, ChemSpider, 2019.
31. F. Namjoyan, F. Kiashi, Z.B. Moosavi, F. Saffari, B. Sharif-Makhmalzadehd, Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *J. Tradit. Complement. Med.*, **6**(1), 37-40 (2016).
32. Self-help Health, *Dragon's Blood: Scary Sounding, Amazing Stuff!*, 2014.
33. R.H. Selwitz, A.I. Ismail, N.B. Pitts, Dental caries, *Lancet*, **369**(9555), 51-59. (2007).
34. H. Cohen, How to write a patient case report, *Am. J. Health-System Pharm.*, **63**(19), 1888-1892 (2006).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

M.E. Londoño-Lemos, O. Bustamante, Development of a new Colombian product, effective for the treatment of carious lesions: case study, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 677-699 (2019).

Análisis por FTIR y DSC de complejos polielectrolito entre Eudragit® E100 y ácido benzoico como evidencia de hidrólisis de los grupos éster del polímero

Leidy J. Dallos¹, Rubén H. Manzo², Yolima Baena^{1*}

¹Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Grupo de Investigación Sistemas para la Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas (SILICOMOBA), Carrera 30 # 45-03, Bogotá D.C., (111311), Colombia. A. A. 14490.

²Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Farmacia, Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), Ciudad Universitaria Córdoba, Argentina.

*Correo electrónico: ybaena@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 27 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 1 de octubre de 2019

RESUMEN

La obtención de complejos polielectrolito entre el polímero catiónico Eudragit® E100 y moléculas aniónicas, con neutralización adicional de un ácido inorgánico, ha sido una práctica recurrente en el área de investigación de estos sistemas de liberación controlada. En el presente trabajo se buscó estudiar el efecto de la adición del ácido fuerte en el polímero, para ello se llevó a cabo la obtención por evaporación de solvente de diez complejos (de diferente composición entre Eudragit® E100 y ácido benzoico o ácido clorhídrico) y de cuatro ionómeros (sin el activo), a los cuales se les realizó análisis por FTIR y DSC.

Los resultados demostraron la obtención de los respectivos complejos polielectrolito y de los ionómeros; además los espectros de FTIR revelaron la relación directa entre la reacción de hidrólisis de los grupos ésteres del polímero y la proporción de HCl adicionada. Los termogramas, por su parte, evidenciaron la existencia de una reacción en el polielectrolito (PE), la cual se favoreció en aquellas composiciones en las que el proceso de hidrólisis ocurrió en mayor magnitud. El proceso de hidrólisis que se describe en el presente estudio debe tenerse en consideración en las futuras investigaciones en el campo, ya que su ocurrencia podría tener implicaciones en las diversas variables que se evalúan en este tipo de sistemas.

Palabras clave: Eudragit® E100, hidrólisis, ácido benzoico.

SUMMARY

FTIR and DSC analysis of polyelectrolyte complexes between Eudragit® E100 and benzoic acid as evidence of hydrolysis of the polymer ester groups

Polyelectrolyte complexes obtention between Eudragit® E100 (cationic polymer) and anionic molecules with additional neutralization of inorganic acids is a common practice in the development of these systems. In the present work the addition of strong acid effect on polymer structure was evaluated through FTIR and DSC analysis of a set of ten complexes with different composition (between Eudragit® E100 and benzoic acid) and four ionomers (without the preservative) obtained by solvent evaporation technique.

Results demonstrated the complexes and ionomers formation. FTIR spectra revealed direct relationship between polymer ester groups hydrolysis reaction and the amount of HCl added. The thermograms, on the other hand, evidenced the existence of a reaction in the polyelectrolyte, which was favored in those compositions with more hydrolysis process. The degradation reaction described in this study should be taken into consideration in future research, since its occurrence could have implications in variables evaluated in this type of systems.

Key words: Eudragit® E100, hydrolysis, benzoic acid.

INTRODUCCIÓN

El Eudragit® E100 (Eu) es un copolímero básico del ácido metacrílico, conformado por grupos dimetilaminoetil metacrilato (DMAE), n-butil metacrilato y metil metacrilato en una proporción molar de 2:1:1; los monómeros se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo de la cadena del copolímero, como se observa en la figura 1.

Debido a que los grupos DMAE son susceptibles a protonación, su interacción iónica con moléculas biológicamente activas (de carácter aniónico) ha sido aprovechada para la obtención de complejos polielectrolito (CPE) con múltiples propósitos, como: aumento de solubilidad aparente, modulación del comportamiento de liberación, incremento de estabilidad de activos y de la permeabilidad intestinal [1-4].

En tales estudios es común neutralizar parte de los grupos DMAE del polímero con un ácido inorgánico, usualmente ácido clorhídrico, con el fin de mejorar la compatibilidad acuosa de los sistemas obtenidos [5], sin embargo, el efecto del ácido fuerte en la estructura del PE no ha sido evaluado a profundidad. En la investigación desarrollada

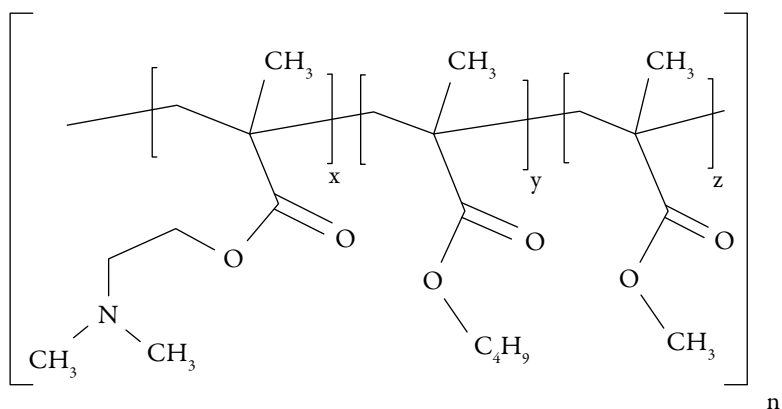


Figura 1. Estructura química del polielectrolito Eudragit® E100.

Fuente: tomado de Evonik Industries [1].

por Villada se evidenció, por primera vez, el fenómeno de hidrólisis de los ésteres del PE como consecuencia de la adición de HCl, no obstante, la reacción fue asociada al método de obtención, ya que se llevó a cabo en medio acuoso [6]. En este estudio se evaluó si se presenta o no la hidrólisis de los ésteres del Eu, en la obtención del CPE, empleando la metodología de evaporación de solvente. Para ello se realizó el análisis de los espectros de FTIR y de los termogramas de DSC, para los sistemas de diferente composición, obtenidos entre el polímero catiónico y los contraiones generados por los ácidos benzoico o clorhídrico; aquellos en los que la neutralización solo fue realizada con el ácido inorgánico se denominaron “ionómeros”.

METODOLOGÍA

Materiales

Ácido benzoico (Sigma-Aldrich), Eudragit® E100 (Evonik Industries), etanol al 96% y ácido clorhídrico (Merck). Para la dilución de HCl se empleó agua desionizada.

Obtención de los complejos y de los ionómeros

Se prepararon diez composiciones diferentes de CPE entre Eudragit® E100 (Eu) y ácido benzoico (B) siguiendo la metodología descrita en estudios previos, con algunas modificaciones [3, 7]. Se realizó la dispersión de 3 g de Eu en 15 ml de etanol con posterior adición de B en cantidad correspondiente a la neutralización del 25%, 50%, 75% y 100% de los grupos dimetilaminoetil (DMAE) del polielectrolito, para la obtención de los complejos, denominados respectivamente: EuB₂₅, EuB₅₀, EuB₇₅ y EuB₁₀₀.

Los otros seis CPE fueron preparados de modo semejante, pero con neutralización adicional (de los grupos DMAE) con HCl al 2,5 M, en proporciones de 25%, 50%, 75%, que permitieran evaluar todas las posibles combinaciones; estos complejos se denominaron: $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{25}$, $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$, $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$, $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{25}$, $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{50}$ y $\text{EuB}_{75}\text{Cl}_{25}$ en función de la composición de contraiones benzoato y cloruro. Los componentes se dejaron interactuar por 5 minutos y para la posterior evaporación del solvente, las dispersiones fueron depositadas en moldes metálicos y secadas hasta peso constante en estufa (Mettler) a 25 °C, a presión ambiente y durante 48 horas. El sólido obtenido se trituró hasta obtener un polvo fino, que se separó por tamices, seleccionando aquel que quedó entre mallas 40/80 (177-420 μm).

Para evaluar el efecto del ácido inorgánico en el PE, se siguió la misma metodología descrita previamente sin la adición de B, para la obtención de los cuatro ionómeros denominados EuCl_{25} , EuCl_{50} , EuCl_{75} y EuCl_{100} , utilizando la nomenclatura ya mencionada, mediante la neutralización de los grupos DMAE del Eu solamente con HCl 2,5 M.

Caracterización por espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Los diez CPE obtenidos, los cuatro ionómeros, B, Eu y una mezcla física (MF) equivalente a la composición del complejo EuB_{100} se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (espectrofotómetro IRPrestige-21/ATR, Shimadzu) empleando la técnica de muestreo de reflectancia total atenuada (ATR), las muestras analizadas fueron representativas de la cantidad total obtenida. Los espectros fueron analizados haciendo uso del programa espectral LabSolutions-IR®.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico de las muestras evaluadas por FTIR fue estudiado mediante calorimetría diferencial de barrido (Analizador Mettler Toledo, DSC1-STAR System). El análisis se realizó bajo atmósfera de nitrógeno (flujo 50 ml/min) en un rango de temperatura entre 0 °C y 180 °C, con un pretratamiento a -20 °C por 10 minutos. La rampa de calentamiento utilizada fue de 10 °C/min. Aproximadamente 7 mg de cada muestra de polímero, complejo, ionómero o mezcla física fueron pesados (Balanza Mettler Toledo ME204), mientras que para el ácido benzoico bastó con un peso de 4 mg. Todas las muestras fueron dispuestas en portamuestras de aluminio con tapa, cerradas herméticamente con la prensa (Mettler Toledo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al seguir la metodología de obtención descrita se prepararon de modo satisfactorio los diez CPE y los cuatro ionómeros.

Caracterización por espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Los resultados de los espectros de infrarrojo se presentan en la tabla 1, en esta se resumen las bandas de absorción de importancia para la formación del complejo: su presencia o número de onda. Adicionalmente, en la figura 2 se observan, a manera de ejemplo, los espectros de absorción para dos de los complejos (EuB_{25} y $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$) y para uno de los ionómeros (EuCl_{50}) cotejados con sus precursores y la mezcla física.

Tabla 1. Bandas de las transiciones vibracionales –de importancia en el proceso de complejación– de los espectros FTIR de los diez complejos obtenidos, los cuatro ionómeros, reactivos de partida y mezcla física (MF).

| | COO-H del B (cm^{-1}) | COO-H fuera del plano de B (cm^{-1}) | C=O (COOH) de B (cm^{-1}) | DMAE de Eu (cm^{-1}) | % T de las bandas DMAE de Eu | |
|--|----------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| | | | | | 2770 cm^{-1} | 2822 cm^{-1} |
| <i>B</i> | 2554-3070 | 931 | 1676 | --- | --- | --- |
| <i>Eu</i> | --- | --- | --- | 2770-2822 | 92,53 | 93,36 |
| <i>MF</i> | 2556-3073 | 934 | 1682 | 2772-2822 | 82,49 | 79,95 |
| <i>EuB</i> ₂₅ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2822 | 94,22 | 94,70 |
| <i>EuB</i> ₂₅ <i>Cl</i> ₂₅ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2824 | 96,25 | 96,43 |
| <i>EuB</i> ₂₅ <i>Cl</i> ₅₀ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2824 | 96,24 | 96,34 |
| <i>EuB</i> ₂₅ <i>Cl</i> ₇₅ | N.O. | N.O. | N.O. | N.O. | N.A. | NA |
| <i>EuB</i> ₅₀ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2822 | 95,05 | 95,13 |
| <i>EuB</i> ₅₀ <i>Cl</i> ₂₅ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2824 | 96,23 | 96,14 |
| <i>EuB</i> ₅₀ <i>Cl</i> ₅₀ | N.O. | N.O. | N.O. | N.O. | N.A. | N.A. |
| <i>EuB</i> ₇₅ | N.O. | N.O. | N.O. | 2772-2824 | 98,03 | 97,90 |
| <i>EuB</i> ₇₅ <i>Cl</i> ₂₅ | N.O. | N.O. | N.O. | N.O. | N.A. | NA |
| <i>EuB</i> ₁₀₀ | N.O. | N.O. | N.O. | N.O. | N.A. | NA |
| <i>EuCl</i> ₂₅ | N.A. | N.A. | N.A. | 2772-2822 | 95,04 | 95,51 |
| <i>EuCl</i> ₅₀ | N.A. | N.A. | N.A. | 2772-2822 | 96,15 | 96,40 |
| <i>EuCl</i> ₇₅ | N.A. | N.A. | N.A. | 2772-2822 | 97,59 | 97,78 |
| <i>EuCl</i> ₁₀₀ | N.A. | N.A. | N.A. | N.O. | N.A. | NA |

N.O.: no observado, N.A.: no aplica.

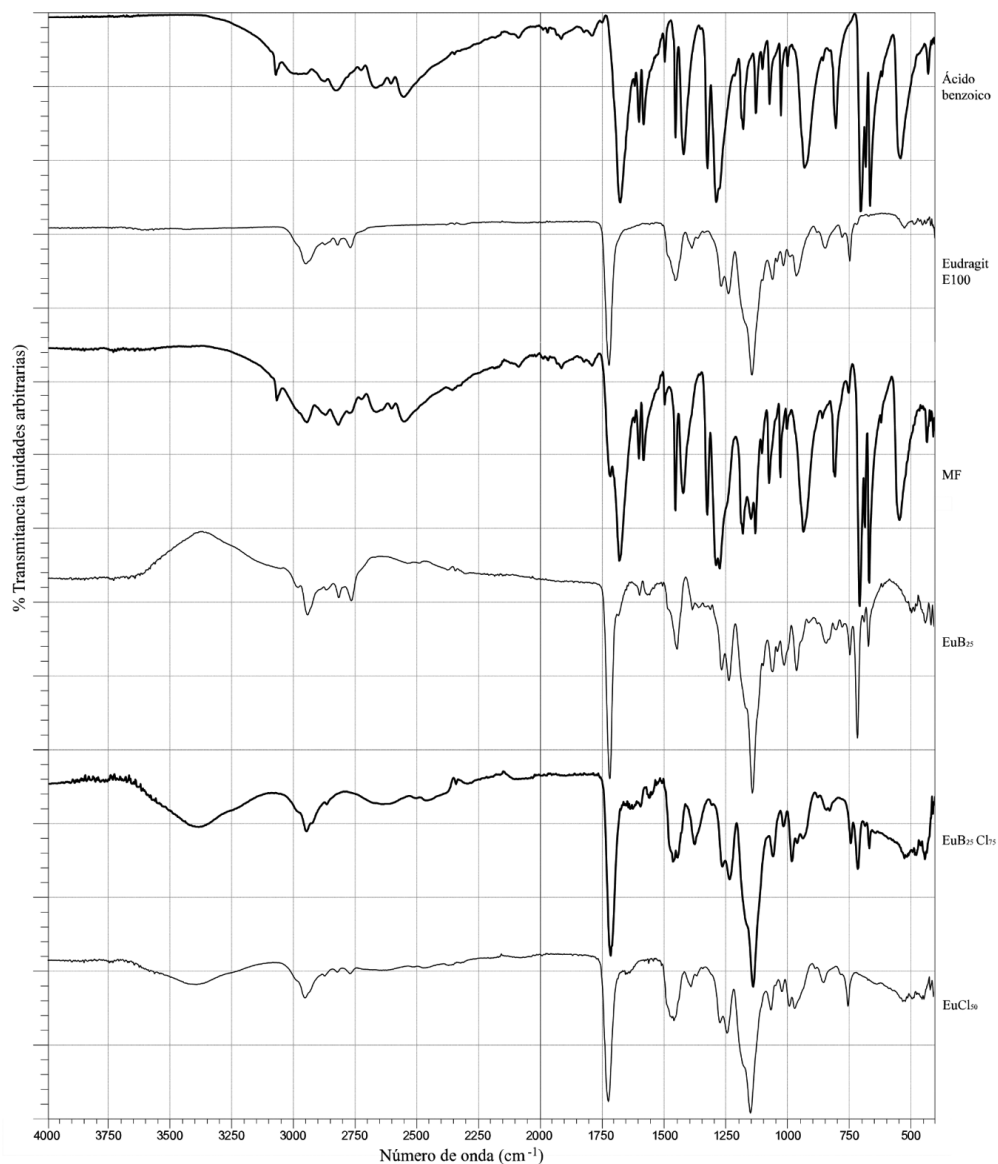


Figura 2. Espectros FTIR de los complejos EuB_{25} y $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$, ionómero EuCl_{50} , B, Eu y MF.

En primer lugar, se observó que los resultados de la caracterización por FTIR relacionados con los precursores de los complejos, es decir de B y de Eu, corresponden a lo reportado en la literatura especializada; en la tabla 2 se relacionan las señales de las transiciones vibracionales de las dos moléculas y el número de onda de sus respectivas bandas. Los resultados para Eu están en línea con lo registrado por los estudios de Lin,

Juppo y de Villada [6, 8, 9]; de igual modo las señales observadas para ácido benzoico concuerdan con lo reportado por Hayashi y Yariv [10-12].

Tabla 2. Señales de FTIR asociadas a Eudragit® E100 y a ácido benzoico.

| | Número de onda de la banda (cm ⁻¹) | Transición vibracional asociada |
|----------------|--|---|
| Eudragit® E100 | 2949 y 2874 | Estiramiento asimétrico de CH ₃ y de los grupos CH ₂ de la cadena principal y del CH ₂ -OR |
| | 2822-2770 | Estiramiento simétrico de los grupos CH ₂ de la cadena ramificada CH ₂ -N-(CH ₃) ₂ |
| | 1722 | Estiramiento de C=O |
| | 1454 y 1487 | Flexión de los grupos CH ₂ de la cadena principal. |
| | 1387 | Estiramiento del grupo CH ₃ (posiblemente del promedio de las bandas C-CH ₃ y N-CH ₃) |
| | 1269 y 1238 | Estiramiento grupo éster C-O. |
| | 1144 | Estiramiento grupo éster C-O y C-N |
| Ácido benzoico | 2554-3070 | Estiramiento O-H (Bandas C-H solapadas) |
| | 1676 | Estiramiento C=O |
| | 1601 y 1582 | Estiramiento C=C aromático. |
| | 1497 y 1452 | C-H del anillo aromático |
| | 1419, 1288 y 1323 | Acoplamiento del estiramiento C-O y flexión OH en el plano |
| | 931 | Flexión O-H fuera del plano |
| | 804 | Estiramiento C-C |
| | 704 | Flexión O-H fuera del plano y anillo aromático |
| 682 y 543 | Flexión en movimiento de tijeras de COO | |

En cuanto a los espectros de FTIR de los complejos, los resultados confirman la formación de la interacción iónica entre Eu y B para las diez composiciones distintas, esto debido a los siguientes tres fenómenos:

1. Desaparición de las bandas asociadas al enlace O-H del ácido benzoico (2557 cm⁻¹, 3070 cm⁻¹, 931 cm⁻¹ y 1685 cm⁻¹), indicando la disociación de la molécula ácida a su equivalente iónico, necesario para la formación del CPE.
2. Disminución en la intensidad de las bandas de los grupos DMAE no protonados del Eu, revelando el efecto de la protonación de estos. Este comportamiento es corroborado con la proporcionalidad entre el porcentaje de transmitancia

(% T) de la banda y el grado de neutralización de los contraiones en cada complejo, puesto que a medida que aumenta el porcentaje de grupos del PE ionizados, mayor es el valor de % T, es decir, la intensidad de la banda es menor.

Es así como para los cuatro complejos que cuentan con la neutralización total de los grupos DMAE del Eu -EuB₂₅Cl₇₅, EuB₅₀Cl₅₀, EuB₇₅Cl₂₅ y EuB₁₀₀- no se observan las bandas mencionadas, mientras que, para aquellos complejos con menores porcentajes de interacción con los contraiones, ya sea benzoato o cloruro, sí son evidentes estas bandas (ubicadas en 2771 cm⁻¹ y 2821 cm⁻¹). En la figura 3 se presenta el fenómeno descrito para la serie de complejos con neutralización del 25 % de los grupos DMAE con B, cotejados con el del polímero, en esta se observa que, a mayor porcentaje de contraiones, las bandas son mucho menos pronunciadas.

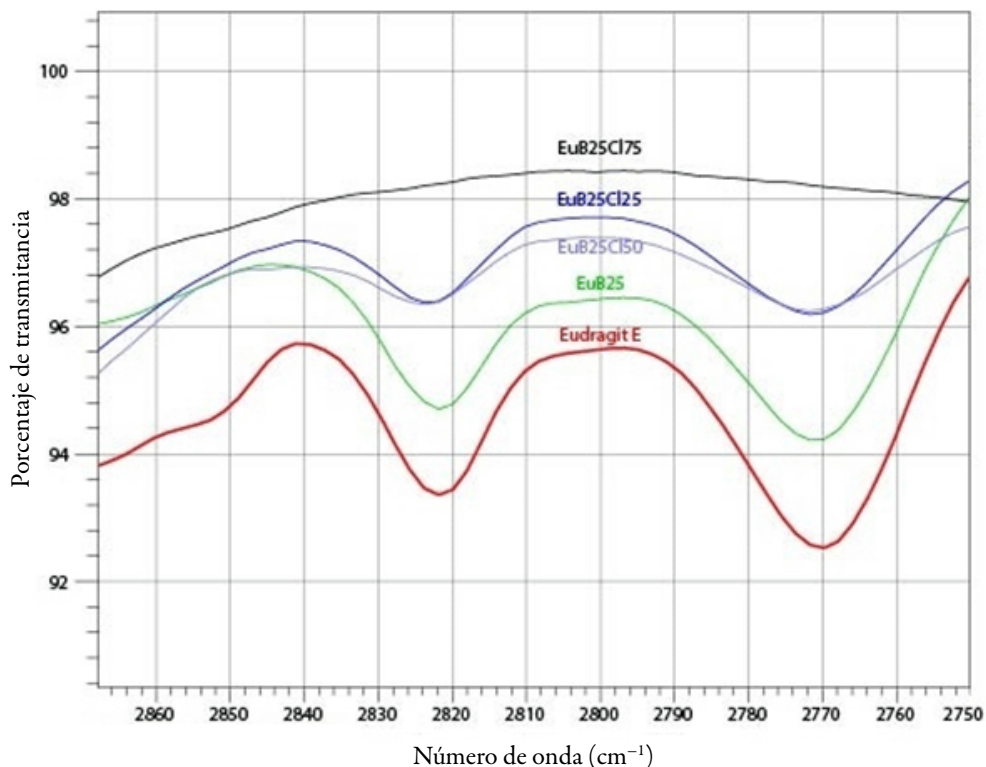


Figura 3. Espectro de FTIR en el rango de 2870 cm⁻¹ a 2750 cm⁻¹ para los complejos con neutralización de B del 25%.

3. El espectro FTIR de la mezcla física equivalente a la composición del complejo EuB_{100} , esta presenta la sumatoria de las bandas de los precursores, tanto las correspondientes al enlace O-H del B, como las de los grupos dimetilamino no protonados del Eu.

Los anteriores hallazgos se encuentran en línea con lo reportado en estudios previos para CPE con Eu como PE [2, 3, 13-15], en todos describen los tres fenómenos mencionados como evidencia inequívoca de la interacción.

Además de la comprobación de la formación de los complejos, los espectros FTIR advirtieron de la presencia de un fenómeno relacionado con la formación de una banda ancha en 3500 cm^{-1} , la cual fue atribuida por Villada J [6] a la aparición de grupos hidroxilo, como resultado de la hidrólisis de los ésteres del polímero por el uso del ácido clorhídrico en el proceso de obtención. En la figura 4 se presenta el fenómeno descrito, ejemplificado con los espectros FTIR de los cuatro complejos con neutralización del 25 % de los grupos DMAE con B, en un rango de número de onda entre 3700 cm^{-1} a 3080 cm^{-1} , en esta se observa que a mayor porcentaje de neutralización con HCl, la banda se hace más pronunciada, lo cual corrobora la teoría de hidrólisis planteada.

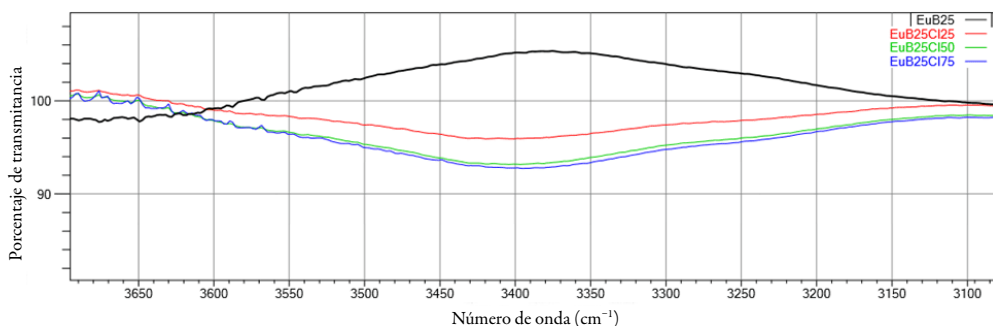


Figura 4. Espectro de FTIR en el rango de 3700 cm^{-1} a 3080 cm^{-1} para los complejos con neutralización de B del 25%.

Con el objetivo de comparar el fenómeno de hidrólisis reportado por Villada J. [6], se analizaron los espectros de los ionómeros (EuCl_{25} , EuCl_{50} , EuCl_{75} y EuCl_{100}), resultados que se presentan en la figura 5, en la que se evidencia un comportamiento semejante al encontrado por Villada aun cuando los métodos de obtención son diferentes, ya que en el estudio previo utilizan agua como solvente y liofilización como método de evaporación.

En cuanto a la reducción de las bandas relacionadas con los grupos DMAE no protonados ubicadas en 2771 cm^{-1} y 2821 cm^{-1} , Villada plantea la hidrólisis de estos grupos como una posible causa para este fenómeno; sin embargo, los espectros FTIR de los

complejos EuB_{75} o EuB_{100} , en los que no se adicionó HCl descartan esta teoría, pues las bandas en 2771 cm^{-1} y 2821 cm^{-1} también se reducen, aun cuando el B no favorece la reacción de hidrólisis, como lo evidenció la ausencia de la banda ancha en 3500 cm^{-1} de los espectros FTIR de EuB_{25} , EuB_{50} , EuB_{75} y EuB_{100} .

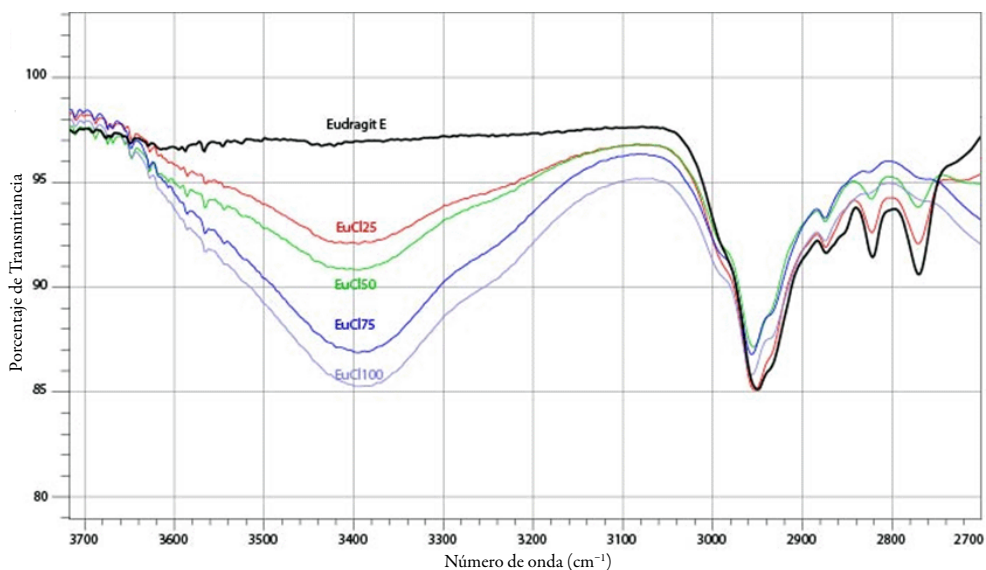


Figura 5. Espectro FTIR en el rango de 3700 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} para Eu y los ionómeros EuCl_{25} , EuCl_{50} , EuCl_{75} y EuCl_{100} .

El proceso de hidrólisis de los grupos éster del polímero tiene lugar mediante sustitución nucleofílica, bajo el mecanismo de reacción ilustrado en la figura 6, de este se deduce que la presencia de un ácido fuerte, como el ácido clorhídrico, cataliza la hidrólisis, dando como resultado una mayor cantidad de grupos de ácido carboxílico [6], que se evidencian por la pronunciación de la banda OH en el espectro de FTIR. Para el método de obtención utilizado, se tiene que aquellos con mayor adición de HCl, cuentan con mayor disponibilidad de agua en la reacción, puesto que el volumen de agua involucrado en la metodología proviene únicamente de la solución de HCl (a concentración constante) y del solvente orgánico (etanol al 96 %), el cual fue el mismo en todos los casos.

En cuanto a los productos asociados a la reacción de hidrólisis de los grupos éster del polielectrolito, se deduce la formación de metanol, n-butanol y 2-(dimetilamino)-etanol. Para estos, se presume su evaporación en el posterior proceso de secado, sin embargo, es de suma importancia el desarrollo de los respectivos estudios que determinen o descarten su presencia o efecto en los complejos o ionómeros obtenidos.

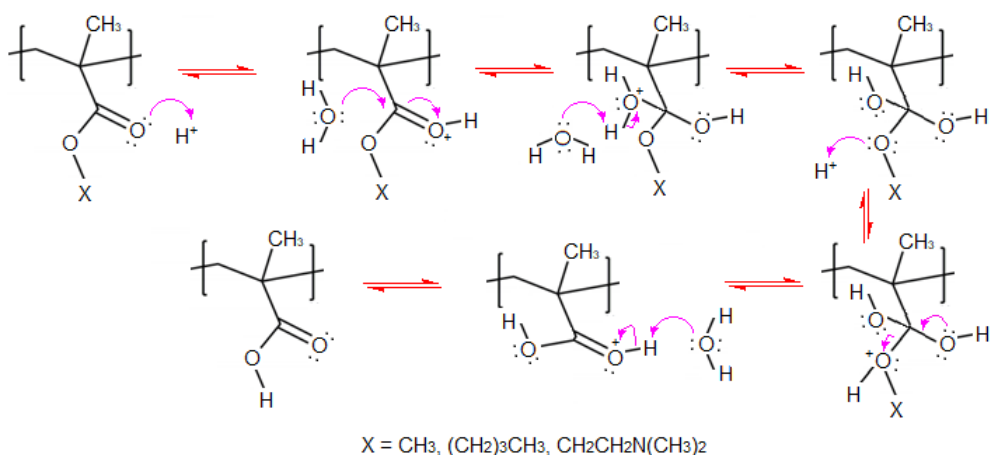


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis de los grupos éster de Eu en medio ácido.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico de todas las muestras se presenta en la figura 7. En el termograma de B se observa un pico bien definido con temperatura de inicio en 118 °C y un máximo de pico a 124,6 °C correspondiente a la transición termodinámica de primer orden debida al proceso de fusión, este resultado está en línea con la temperatura de fusión (T_f) reportada para B (122 °C) [16]; en el rango de temperatura evaluado no se observa ningún proceso de descomposición para el ácido benzoico [17].

El resultado para el polímero Eu corresponde al segundo ciclo de calentamiento de la muestra, ya que en el primero se observó un pico endotérmico debido a la entalpía de relajación del polímero; fenómeno cinético que refleja el estado de las cadenas poliméricas a condiciones de almacenamiento inferiores a su temperatura de transición vítrea (T_g), en específico para aquellos en los que el enfriamiento del polímero es tan rápido que las cadenas no tienen la oportunidad de encontrar orientaciones energéticamente favorables antes de solidificarse [18]. Para la determinación de la T_g se calculó la segunda derivada del flujo de calor, en este caso 42,0 °C, valor que se encuentra dentro del rango declarado por el fabricante (45 °C \pm 5 °C) [1]. El perfil de DSC de la mezcla física presentó dos picos endotérmicos: el primero asociado a la T_g de Eu a una temperatura de 58,0 °C y el segundo pico a 121,6 °C, relacionado con el proceso de fusión del ácido benzoico, que a diferencia del compuesto puro contó con una base de pico bastante amplia, incluso con temperatura de inicio en 62,0 °C y con una intensidad mucho menor de la esperada, este fenómeno ha sido reportado para mezclas físicas de estudios semejantes [2, 14, 19, 20]; este efecto es atribuido a la interacción *in situ* entre

el polímero y el compuesto activo, favorecida por las condiciones del análisis del DSC que se asemejan a las de obtención de CPE por el método de extrusión por fusión, que ha demostrado gran utilidad en la formación de la interacción iónica [19].

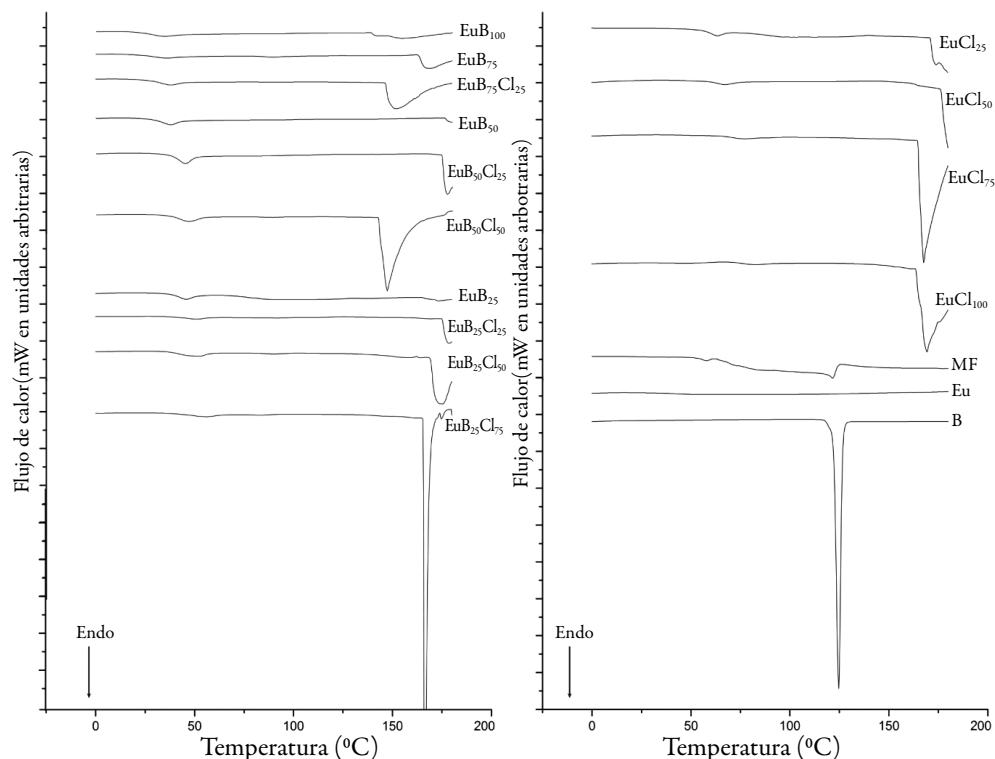


Figura 7. Termogramas de los diez complejos, los cuatro ionómeros, reactivos de partida y mezcla física (MF).

Para todos los termogramas de los complejos se observa un pico endotérmico de baja intensidad a valores de temperatura entre 33 °C y 58 °C asociado al Eu, asimismo se observa la ausencia del evento correspondiente al proceso de fusión de B, evidenciando una distribución a nivel molecular del activo en el polímero. En el fenómeno endotérmico suceden de modo concomitante los eventos de relajación y de transición vítrea del polímero, ya que ocurre un descenso de línea base (típico de la transición vítrea), después del pico endotérmico (asociado a la relajación entálpica), a pesar de ello no se determinó la T_g en un segundo ciclo de análisis térmico, puesto que la formación de los CPE se favorece con el aumento de temperatura, de modo que un termograma obtenido en un ciclo adicional de calentamiento puede reflejar los procesos que tienen lugar en el primero y no los resultados asociados a la propia obtención de los complejos.

La determinación de la T_g se realizó mediante el cálculo de la segunda derivada, cuyos resultados se presentan en la tabla 3, en la que además se incluye la información para Eu, la mezcla física y la T_f relacionada con el ácido benzoico. Como tendencia general se observa que el contraión benzoato genera una disminución del valor de la temperatura de transición vítrea, mientras que el contraión cloruro favorece su aumento. El efecto del contraión benzoato está en línea con lo reportado en estudios previos [2, 21-25], en los que la adición de compuestos orgánicos a polímeros reduce el valor de su temperatura de transición vítrea, fenómeno atribuido a un efecto plastificante que tiene lugar por la ubicación de moléculas del compuesto de bajo peso molecular entre las moléculas del polímero. Esto conlleva a un aumento del volumen libre y al incremento de la movilidad molecular, afectando la disposición “enredada” (entanglement) de las cadenas y las fuerzas cohesivas entre ellas, de modo que una menor transferencia de energía es requerida para el paso del material de “vítrea” a “gomoso”.

Tabla 3. Valores de T_f y T_g asociados a los termogramas obtenidos, para los complejos, compuestos de partida y mezcla física.

| | T_f (°C) | T_g (°C) |
|--|------------|------------|
| B | 124,6 | -- |
| Eu | -- | 42,0 |
| Mezcla Física | 121,6 | 58,0 |
| EuB₂₅ | -- | 46,0 |
| EuB₂₅Cl₂₅ | -- | 51,6 |
| EuB₂₅Cl₅₀ | -- | 53,6 |
| EuB₂₅Cl₇₅ | -- | 57,3 |
| EuB₅₀ | -- | 38,3 |
| EuB₅₀Cl₂₅ | -- | 45,0 |
| EuB₅₀Cl₅₀ | -- | 45,0 |
| EuB₇₅ | -- | 36,7 |
| EuB₇₅Cl₂₅ | -- | 38,3 |
| EuB₁₀₀ | -- | 33,3 |
| EuCl₂₅ | -- | 63,3 |
| EuCl₅₀ | -- | 67,9 |
| EuCl₇₅ | -- | 75,0 |
| EuCl₁₀₀ | -- | 83,7 |

Incertidumbre reportada para la medición de temperatura: 0,2 °C [26].

La neutralización con ácido clorhídrico genera el efecto opuesto al observado con ácido benzoico: en todos los casos se mantiene o aumenta la temperatura de transición vítrea, comportamiento que está relacionado con el tamaño del contraión. En un estudio de indometacina en estado amorfo [27] se encontró que al aumentar el tamaño del contraión, la fuerza electrostática entre el catión y el grupo carboxilato del principio activo disminuía y a su vez el valor de la T_g . Para los complejos obtenidos en este estudio, la neutralización con el ácido inorgánico genera aniones cloruro de bajo tamaño y por tanto con una interacción iónica de mayor fuerza con los grupos DMAE que la producida con los aniones benzoato, tales fuerzas heteromoleculares —de mayor magnitud a las interacciones homomoleculares presentes en el polímero puro— ocasionan un incremento en la densidad del material y reducción del volumen libre, que se reflejan en mayores temperaturas necesarias para superar la transición vítrea.

Para confirmar el efecto del contraión cloruro en la T_g , se analizaron los resultados obtenidos para los cuatro ionómeros y se compararon con los reportados en dos estudios previos. En la figura 8 se presentan los datos de las tres investigaciones, en esta se observa que para todos los casos el valor de T_g aumenta a medida que se incrementa el grado de neutralización del polímero con ácido clorhídrico, pese a ello, existen diferencias de hasta 50 °C en los resultados. Villada *et al.* [6] atribuyen la disminución de sus valores, respecto a los de Guzmán *et al.* [14], a la hidrólisis de los grupos DMAE que conlleva a la disminución en la cantidad de puentes salinos que pueden formar los materiales y sugieren utilizar otra metodología que no promueva la reacción de degradación del polímero, no obstante, en el presente estudio se utilizó la misma metodología de Guzmán y como lo indican los espectros de FTIR la hidrólisis de los grupos DMAE también tuvo lugar, por tanto, se presume que la reacción de hidrólisis en los complejos obtenidos por Guzmán *et al.* también ocurrió, aunque no fue reportada, de modo que la hipótesis de Villada *et al.* para explicar las diferencias entre valores de T_g es desestimada.

Es importante señalar que la transición vítrea, bien conocida por representar un “salto” en la capacidad calorífica (C_p), es una transición que no va acompañada de una entalpía propia, por ello el fenómeno es similar a una transición termodinámica de segundo orden, pero no es una transición termodinámica verdadera, pues depende del tiempo [28], es así como algunos parámetros de análisis como la velocidad de calentamiento afectan drásticamente el valor de T_g , de hecho en el estudio desarrollado por Qi Sheng *et al.* [24] se observó un aumento de hasta de 20°C en la temperatura de transición vítrea al pasar de 5 °C/min a 100 °C/min, dado que una mayor rampa de calentamiento no proporciona el tiempo suficiente para el movimiento de las cadenas poliméricas y desencadena en valores de T_g mayores.

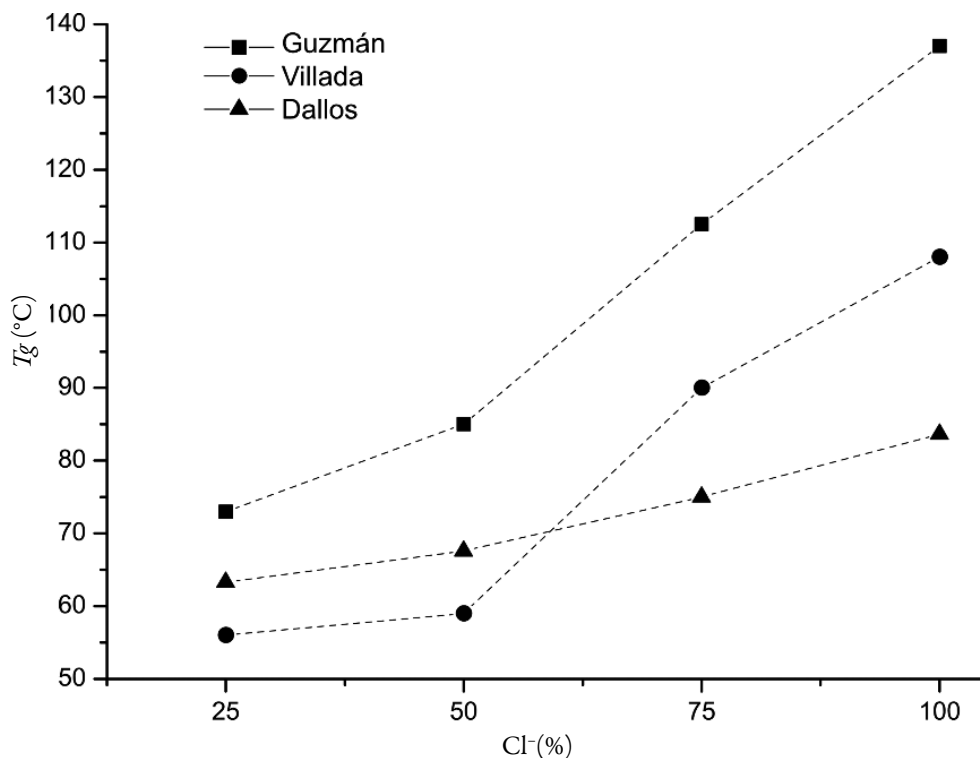


Figura 8. Temperaturas de transición vítrea T_g para los ionómeros $\text{EuCl}_{(25-100)}$ reportadas por los autores: (■) Guzmán [14], (●) Villada [6] y los obtenidos en el presente estudio (▲) (Dallos).

Asimismo, la técnica de DSC utilizada, juega un papel fundamental en el estudio de la transición vítrea: en el reporte de Villada *et al.* [6] inicialmente la determinan mediante DSC convencional y obtienen resultados muy similares a los graficados en la figura 8 como “Dallos”, pero cuando reproducen los análisis en DSC modulado obtienen valores de mayor magnitud. En este sentido, las diferencias entre los resultados de los tres estudios pueden explicarse como el producto de las divergencias en los análisis, ya sea por rampa de calentamiento, técnica de análisis, número de ciclos calentamiento-enfriamiento, entre otros.

En cuanto a los termogramas presentados en la figura 7, vale la pena señalar una particularidad observada para los complejos y los ionómeros, en los que se presenta un pico endotérmico hacia la parte final de cada análisis, este pico es menos evidente para aquellos complejos en los que la neutralización de los grupos DMAE fue realizada únicamente con ácido benzoico, pero para los termogramas de los sistemas que contaron con una neutralización adicional con HCl el fenómeno endotérmico ocurrió con una

mayor intensidad, tal como se observa para el complejo $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{75}$ en el que se presenta un pico bien definido y bastante pronunciado.

En la tabla 4 se resume la información de temperatura máxima a la que sucede el evento endotérmico descrito y el valor del flujo de calor registrado para tal temperatura, asimismo en la figura 9 se representan tales resultados de temperatura en función de la composición para los diez complejos en estudio, a partir de estos se puede afirmar que –con la única excepción del complejo EuB_{25} en el que el fenómeno descrito fue casi imperceptible– a mayor porcentaje de neutralización de los grupos DMAE del polímero el evento endotérmico tuvo lugar a una menor temperatura.

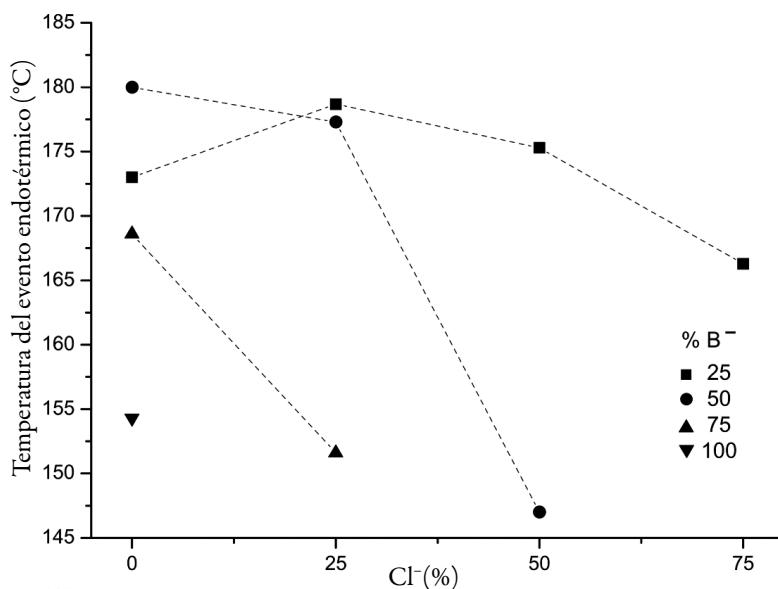
Generalmente, el evento endotérmico descrito es adjudicado a la presencia de transiciones relacionadas con la mezcla de las diferentes especies del polímero: fracciones de cadena corta, cadenas largas, secciones entrecruzadas, entre otros [15]; en este sentido es posible que la hidrólisis del polímero descrita en el análisis de FTIR de lugar a las especies químicas mencionadas y por ello el pico endotérmico es de mayor intensidad cuando hay una mayor cantidad de ácido clorhídrico involucrado en el proceso de obtención del complejo. Pese a ello, es viable que el fenómeno endotérmico esté relacionado con otra reacción de degradación del polímero como la ciclación; en estudios previos [8, 29] se ha reportado para Eu la formación de un anhídrido cíclico de seis miembros inducido térmicamente a temperaturas superiores a los 180 °C, cuya reacción se presenta en la figura 10.

La reacción intramolecular reportada en los estudios de Lin *et al.* [29] ocurre vía condensación de ésteres sin adición de ningún iniciador o catalizador, únicamente requiere del proceso de calentamiento; su hallazgo fue realizado en un equipo de micro espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier acoplado a calorimetría diferencial de barrido (FTIR/DSC) y consistió en el rastreo de la desaparición de las bandas de infrarrojo de los grupos de DMAE y la aparición de bandas en 1801 cm^{-1} y 1763 cm^{-1} asociadas al grupo carbonilo y de la banda 1007 cm^{-1} correspondiente al estiramiento asimétrico C-O-C, todas ubicadas a la longitud de onda característica de compuestos anhídridos.

El mecanismo de reacción bajo el cual se rige aún no ha sido caracterizado, sin embargo, por tratarse de un proceso mediado por calor es bastante probable que la reacción sea favorecida si los sustituyentes R_1 y R_2 de la estructura del Eu son de menor tamaño, es decir para los complejos en los que se demostró mediante FTIR un mayor grado de hidrólisis y en los que algunos de los sustituyentes R_1 y R_2 han sido reemplazados por el grupo –OH. Para corroborar esta teoría se realizó el análisis de infrarrojo luego de realizado el estudio de DSC para las muestras de los complejos $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{25}$, $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$ y $\text{EuB}_{50}\text{Cl}_{25}$.

Tabla 4. Valores de temperatura y flujo de calor asociados al evento endotérmico presente la parte final de los termogramas.

| | Temperatura del evento endotérmico (°C) | Flujo de calor asociado (mW) |
|--|---|------------------------------|
| EuB₂₅ | 173,0 | -2,26 |
| EuB₂₅Cl₂₅ | 178,7 | -4,41 |
| EuB₂₅Cl₅₀ | 175,3 | -9,09 |
| EuB₂₅Cl₇₅ | 166,3 | -69,77 |
| EuB₅₀ | 180,0 | -2,73 |
| EuB₅₀Cl₂₅ | 177,3 | -7,45 |
| EuB₅₀Cl₅₀ | 147,0 | -12,06 |
| EuB₇₅ | 168,6 | -4,41 |
| EuB₇₅Cl₂₅ | 151,6 | -5,75 |
| EuB₁₀₀ | 154,3 | -3,28 |
| EuCl₂₅ | > 180 | N. A. |
| EuCl₅₀ | > 180 | N. A. |
| EuCl₇₅ | 167,7 | -19,51 |
| EuCl₁₀₀ | 169,3 | -13,72 |

**Figura 9.** Temperaturas del evento endotérmico para los complejos EuB₂₅Cl_x (■), EuB₅₀Cl_x (●), EuB₇₅Cl_x (▲) y EuB₁₀₀ (▼). En el eje X se presenta el porcentaje de grupos DMAE neutralizado con ácido clorhídrico.

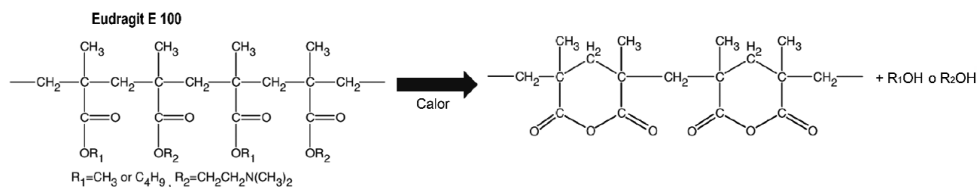


Figura 10. Formación del anhídrido cíclico de seis miembros en Eudragit® E 100.

Fuente: adaptado de Shan-Yang Lin [29].

La selección de estos complejos obedeció a la necesidad de rastrear las bandas en 2822 cm^{-1} y 2770 cm^{-1} correspondientes a DMAE, pues en el espectro inicial de FTIR de estos complejos aún se observan estas bandas ya que en su composición no se realiza la neutralización del cien por ciento de los grupos protonables del polímero. El espectro de FTIR de los tres complejos arrojó resultados muy semejantes. En la figura 11 se presentan los resultados para $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$, en este se observan los cambios relacionados con la formación del anhídrido cíclico: por un lado, se desvanecen las bandas del DMAE y por otro aparecen aquellas en 1801 cm^{-1} , 1757 cm^{-1} y 996 cm^{-1} . En este sentido es posible adjudicar el evento endotérmico observado en la parte final de cada termograma a la reacción de ciclación intramolecular, que se favorece para aquellas composiciones en las que ha ocurrido el proceso de hidrólisis, de allí que los complejos con mayor porcentaje de grupos cloruros como contraión presentan el evento a una menor temperatura y con una mayor intensidad.

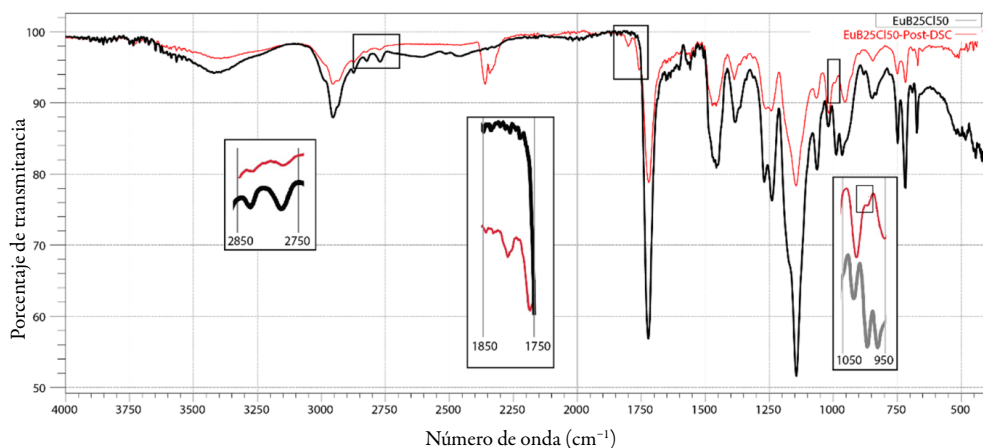


Figura 11. Comparación del espectro de FTIR para el complejo $\text{EuB}_{25}\text{Cl}_{50}$ antes y después del análisis de DSC.

CONCLUSIONES

El análisis de FTIR de los ionómeros y de los complejos obtenidos entre Eu y B demostró una estrecha relación entre la proporción de ácido clorhídrico adicionada en el proceso de obtención y la formación de la banda -OH, indicadora del proceso de hidrólisis de los grupos ésteres del polímero, aun cuando la preparación se realizó en medio orgánico. Asimismo, el estudio de los resultados de DSC evidenció la presencia de un evento endotérmico entre 147 y 180 °C, el cual fue asociado a la formación del anhídrido cíclico de seis miembros en el polímero, que ocurrió a valores de menor temperatura cuando los sistemas analizados contaban con un proceso de hidrólisis de mayor magnitud (según los espectros de FTIR).

Estos resultados revelan el efecto del contraión cloruro en la estructura del PE, cuando se lleva a cabo la obtención de complejos o ionómeros por la metodología de evaporación de solvente y son de gran importancia debido a que existen múltiples investigaciones de CPE con Eudragit® E 100 en las cuales no se ha tenido en cuenta la posible influencia de la hidrólisis, de los grupos ésteres del polímero, en las diversas variables evaluadas.

AGRADECIMIENTOS

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

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Evonik Nutrition and Care GmbH, *Technical Information of Eudragit® E100, Eudragit® E PO and Eudragit E® 12,5*, Specification and Test Methods of Evonik Industries, 1, 2015.
2. M.V. Ramírez-Rigo, M.E. Olivera, M. Rubio, R.H. Manzo, Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **55**, 1 (2014).

3. D.A. Quinteros, V.R. Rigo, A.F. Jimenez-Kairuz, M.E. Olivera, R.H. Manzo, D.A. Allemandi, Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **33**, 72 (2008).
4. R.H. Manzo, A.F. Jimenez-Kairuz, M.E. Olivera, F. Alovero, M.V. Ramírez-Rigo, Thermodynamic and rheological properties of polyelectrolyte systems. En: *Polyelectrolytes, Thermodynamics and Rheology*, Ed. por P.M Visakh, O. Bayraktar, G.A. Pico, Springer, Nueva York, 2014, pp. 215-226.
5. M.E. Olivera, R.H. Manzo, F. Alovero, A.F. Jimenez-Kairuz, Polyelectrolyte-drug ionic complexes as nanostructured drug carriers to design solid and liquid oral delivery systems. En: *Nanostructures for Oral Medicine*, Ed. por E. Androescu, A. Grumezescu, Elsevier, Amsterdam, 2017, pp. 365-408.
6. J.D. Villada, *Obtención y caracterización estructural por FTIR de los materiales iónicos clorhidrato, acetato y formiato de Eudragit E-100 con diferentes grados de ionización*, Tesis de grado, Universidad ICESI, Cali, 2015, pp. 36-51.
7. Y. Baena, L.J. Dallos, R.H. Manzo, L.F. Ponce D'León, Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **40**, 174 (2011).
8. S.Y. Lin, H.L. Yu, M.J. Li, Formation of six-membered cyclic anhydrides by thermally induced intramolecular ester condensation in Eudragit E film, *Polymer*, **40**, 3589 (1999).
9. A.M. Juppo, C. Boissier, C. Khoo, Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS, *Int. J. Pharm.*, **250**, 385 (2003).
10. S. Hayashi, J. Umemura, Disappearances of COOH infrared bands of benzoic acid, *J. Chem. Phys.*, **60**, 2630 (1974).
11. S. Hayashi, N. Kimura, Infrared spectra and molecular configuration of benzoic Acid, *Bull. Inst. Chem. Res. - Kyoto Univ.*, **44**, 335 (1966).
12. S. Yariv, J.D. Russell, V.C. Farmer, Infrared study of the adsorption of benzoic acid and nitrobenzene in montmorillonite, *Isr. J. Chem.*, **4**, 201 (1966).
13. Y. Baena, R.H. Manzo, L.F. Ponce D'Leon, Preparation and physicochemical characterization of some polyelectrolyte-diclofenac complexes, *Vitae*, **18**, 305 (2011).

14. M.L. Guzmán, R. H. Manzo, M.E. Olivera, Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine, *Mol. Pharm.*, **9**, 2424 (2012).
15. C.H. Salamanca, D.F. Castillo, J.D. Villada, G.R. Rivera, Physicochemical characterization of *in situ* drug-polymer nanocomplex formed between zwitterionic drug and ionomeric material in aqueous solution, *Mater. Sci. Eng. C*, **72**, 405 (2017).
16. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen, *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th ed., American Pharmacists Association and Pharmaceutical Press London, London, 2006.
17. K. Winter, D. Barton, The thermal decomposition of benzoic acid, *Can. J. Chem.*, **48**, 3797 (1970).
18. A. Kelly, C. Zweben (editors), *Comprehensive Composite Materials, Volume 5, Test Methods, Nondestructive evaluation, and Smart materials*, Elsevier, 2000, p. 183.
19. H. Liu, P. Wang, X. Zhang, F. Shen, C.G. Gogos, Effects of extrusion process parameters on the dissolution behavior of indomethacin in Eudragit®E PO solid dispersions, *Int. J. Pharm.*, **383**, 161 (2010).
20. J. Li, I.W. Lee, G.H. Shin, X. Chen, H.J. Park, Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **94**, 322 (2015)
21. M.R. Jenquin, S.M. Liebowitz, R.E. Sarabia, J.W. McGinity, Physical and chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin films, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 811 (1989).
22. C. Wu, J.W. McGinity, Non-traditional plasticization of polymeric films, *Int. J. Pharm.*, **177**, 15 (1999).
23. M.A. Repka, T.G. Gerding, S.L. Repka, J.W. McGinity, Influence of plasticizers and drugs on the physico-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion, *Drug Dev. Indust. Pharm.*, **25**, 625 (1999).
24. S. Qi, A. Gryczke, P. Belton, D.Q.M Craig, Characterisation of solid dispersions of paracetamol and Eudragit® E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis, *Int. J. Pharm.*, **354**, 158 (2008).

25. J. Zhang, M. Bunker, A. Parker, C.E. Madden-Smith, N. Patel, C.J. Roberts, The stability of solid dispersions of felodipine in polyvinylpyrrolidone characterized by nanothermal analysis, *Int. J. Pharm.*, **414**, 210 (2011).
26. Mettler Toledo DSC 1 Specifications, *Thermal Analysis Excellence - DSC1-STARe System – Differential Scanning Calorimetry for all Requirements*, 14, 2011.
27. P. Tong, L.S. Taylor, G. Zograf, Influence of alkali metal counterions on the glass transition temperature of amorphous indomethacin salts, *Pharm. Res.*, **19**, 649 (2002).
28. ASTM International, *Standard Test Method for Assignment of the Glass Transition Temperatures by Differential Scanning Calorimetry*, Designation: E1356-08 (Reapproved 2014), developed by Subcommittee: E37.01.
29. S.Y. Lin, W.T. Cheng, Y.S. Wei, H.L. Lin, DSC-FTIR microspectroscopy used to investigate the heat-induced intramolecular cyclic anhydride formation between Eudragit E and PVA copolymer, *Polym. J.*, **43** 577 (2011).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.J. Dallos, R.H. Manzo, Y. Baena, Análisis por FTIR y DSC de complejos polielectrolito entre Eudragit® E100 y ácido benzoico como evidencia de hidrólisis de los grupos éster del polímero, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 700-721 (2019).

Volumetric behaviour of tetra-*n*-butyl ammonium bromide in various solvents at different temperatures

Shipra Baluja*, Elham Abdullah Mo Alnayab

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

*Correo electrónico: shipra_baluja@rediffmail.com

Received: July 11, 2019

Accepted: October 1, 2019

ABSTRACT

Measurement of ultrasonic velocity, density and viscosity of solutions of Tetra Butyl Ammonium Bromide have been carried out in different solvents (water, methanol, ethanol, 1-propanol and 1-butanol) as functions of concentration (1 to 0.1 M) at different temperatures (298.15 K to 318.15K). Using these experimental data, various acoustical and apparent parameters such as acoustical impedance, intermolecular free length, adiabatic compressibility, molar compressibility, Van der Waals constant, relaxation strength, apparent molar isentropic compressibility, apparent molar volume have been evaluated. Further, some thermodynamic parameters such as Gibbs free energy of activation, enthalpy and entropy of activation have been evaluated. All these parameters have been evaluated to understand type of interactions present in studied solutions.

Key words: Tetra Butyl Ammonium Bromide, water, methanol, ethanol, 1-propanol, 1-butanol, acoustical and apparent parameters, Molecular interactions.

RESUMEN

Comportamiento volumétrico del bromuro de tetra-*n*-butilamonio en varios solventes a diferentes temperaturas

La medición de la velocidad ultrasónica, la densidad y la viscosidad de algunas soluciones de bromuro de tetra-*n*-butilamonio se llevó a cabo en diferentes solventes (agua, metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol) en función de la concentración (1 a 0,1 M) y a diferentes temperaturas (298,15 K a 318.15 K). Utilizando estos datos experimentales, se evaluaron varios parámetros acústicos y aparentes, como la impedancia acústica, la longitud libre intermolecular, la compresibilidad adiabática, la compresibilidad molar, la constante de Van der Waals, la fuerza de

relajación, la compresibilidad isentrópica molar aparente, el volumen molar aparente, etc. Además, se evaluaron algunos parámetros termodinámicos, como la energía de activación libre de Gibbs, la entalpía y la entropía de activación. Todos estos parámetros han sido evaluados para comprender el tipo de interacciones presentes en las soluciones estudiadas.

Palabras clave: bromuro de tetra-*n*-butilamonio, agua, metanol etanol, 1-propanol, 1-butanol, parámetros acústicos y aparentes, interacciones moleculares.

INTRODUCTION

One of most economical class of industrial compounds is quaternary ammonium salts which are known of their bioactive and surface active properties [1-5]. These salts consist of positively charged nitrogen atom with long or short chains and organic anions. However, these salts with cations of larger radii do not form strong hydrogen bonds with other solvent molecules in solution [6]. The ammonium ions with long alkyl chains have a strong tendency to enable the surrounding water molecules to form the clathrate like structure even in aqueous solution [7]. Due to the presence of both hydrophilic and hydrophobic groups in these quaternary ammonium salts, they have some peculiar properties such as high viscosities, long dielectric relaxation time, high apparent molar heat capacities and molar volume, low surface charge density, improved thermal and chemical stability etc.[8-14]. So, these quaternary ammonium salts with low melting points are also considered as ionic liquids [15, 16].

These quaternary ammonium ionic liquids are used in specific applications as pesticides, fungicides corrosion inhibitors, disinfectants, emulsifiers, surfactants catalysis, lubricant, coating materials etc. [17-25]. Further, these ionic liquids are used as electrolytes in high energy devices [26]. Quaternary ammonium salts are also used as ingredients in hair conditioners, shampoos and toothpastes [27]. Recently, tetra butyl ammonium bromide has emerged as mild, water-tolerant, inexpensive and environmentally compatible homogenous catalyst in various organic transformations [28-30].

Owing to their various applications in various fields, it would be interesting to study their volumetric properties in solutions. In recent years, the ultrasonic, volumetric and viscometric techniques have gained much importance due to their ability of characterizing physiochemical behavior of liquid systems [31-33]. These parameters enable evaluation of some useful thermodynamic and transport parameters, which can be used to explain the nature and extent of molecular interactions qualitatively; because the properties of pure substances are different from their mixtures [34, 35].

In the present work, acoustical and volumetric properties of an ionic liquid; tetra-*n*-butyl ammonium bromide (TBAB) have been studied in different solvents (water, methanol, ethanol, 1-propanol and 1-butanol) at different temperatures over a wide range of concentrations. A tetra alkyl ammonium cation is regarded as large spherical ion and a solute with hydrophobic surface [36] which affect the interactions in solutions. Thus, the volumetric behaviour of TBAB in different solvents can provide information regarding solute-solute and solute-solvent interactions.

Materials

The tetra-*n*-butyl ammonium bromide (TBAB) was purchased from Dutt Chemicals (Bhavnagar, India) and was used as such. The solvents, water, methanol, propanol, butanol were of HPLC grade supplied by Spectrochem Pvt. Ltd (Mumbai, India) and were purified by standard procedure [37]. The ethanol was supplied by Shree Chalthan Vibhag Khand UdyogSahakari Mandii Ltd. (Surat, India). The solutions of tetra-*n*-butyl ammonium bromidewere prepared in different alcohols over a wide range of concentrations. An electrical balance (Mettler Toledo AB204-S) with an accuracy of ± 0.1 mg was used for the preparation of solutions.

Measurements of density, viscosity and ultrasound velocity

The density and sound velocity of pure water, selected alcohols and solutions of TBAB were measured at different temperatures (298.15, 308.15, and 318.15 K) using Anton Paar sound velocity and density meter (DSA 5000M) with accuracies of $0.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ and $0.005 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, respectively. The model DSA 5000 M simultaneously determines two physically independent properties within one sample. The two-in-one instrument is equipped with a density cell and a sound velocity cell thus combining the proven Anton Paar oscillating U-tube method with a highly accurate measurement of sound velocity. Both cells are temperature controlled by a built-in Peltier thermostat.

The viscosities of water, selected alcohols and different solutions of studied ionic liquid were measured at different temperatures (298.15, 308.15, and 318.15 K) using an Ubbelohde viscometer with a standard relative uncertainty of ± 0.09 . The temperature was controlled by the digital temperature controller of the NOVA viscosity bath with an accuracy of $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. The pure solvent/solutions were allowed to attain the desired temperature in the viscosity bath before the measurements. A digital stopwatch with an accuracy of 0.01 s (Hanhart, Güttenbach, Germany) was used to measure the flow time of water, pure solvents and solutions.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimentally measured density, sound velocity and sound velocity of pure water and selected alcohols are listed in table 1 along with literature values. It is observed that measured values are in good agreement with those reported in literature.

Table 1. Experimental values of density, sound velocity and viscosity of pure solvents at 298.15K.

| Solvents | Density, kg.m ⁻³ | Sound velocity, m.s ⁻¹ | Viscosity, 10 ³ Pa.s |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Water | 997.052 (997.00 ^{82*}) | 1496.49 (1496.39 ^{83*}) | 0.890 (0.890 ^{82*}) |
| Methanol | 786.814 (786.636 ^{84*}) | 1102.63 (1102.54 ^{84*}) | 0.542 (0.542 ^{85*}) |
| Ethanol | 787.043 (786.60 ^{86*}) | 1148.11 (1145.0 ^{86*}) | 1.070 (1.079 ^{86*}) |
| Propanol | 799.606 (799.620 ^{84*}) | 1205.46 (1205.81 ^{84*}) | 1.901 (1.915 ^{87*}) |
| Butanol | 805.998 (805.90 ^{88*}) | 1239.67 (1239.72 ^{84*}) | 2.547 (2.520 ^{89*}) |

(*) The values in parenthesis are from literature.

The measured density, sound velocity and viscosity of solutions of tetra butyl ammonium bromide (TBAB) in different solvents are presented in table 2 at different temperatures. It is evident from table 2 that density, velocity, viscosity values of all solvents increase with increase the concentration and decreases with increase the temperature except for water, where at lower concentrations, velocity increases with increase in temperature.

From these experimental data, various acoustical and apparent properties have also been evaluated using equations reported earlier [38-40]:

Acoustical impedance (*Z*): $Z = U\rho$

Where *U* is the sound velocity and ρ is the density of solution.

Adiabatic compressibility (κ_s): $\kappa_s = \frac{1}{\rho U^2}$

Intermolecular free path length (*L_f*): $L_f = K_j \kappa_s^{1/2}$

Where *K_j* is a temperature dependent Jacobson's constant $((93.875 + 0.375T) \cdot 10^{-8})$.

Relaxation strength (*r*): $r = 1 - \left(\frac{U}{U_\infty} \right)$

Where *U_∞* is Schaff's limiting value taken as 1600 m/s for liquids.

Table 2. The density, sound velocity and viscosity of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | 298.15K | | | 308.15K | | | 318.15K | | |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Density, kg/m ³ | Velocity, ms ⁻¹ | Viscosity .10 ³ Pa.s | Density, kg/m ³ | Velocity, m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s | Density kg/m ³ | Velocity m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s |
| Water | | | | | | | | | |
| 0.10 | 999.481 | 1520.3 | 1.002 | 996.269 | 1539.66 | 0.809 | 992.271 | 1552.90 | 0.670 |
| 0.20 | 1002.15 | 1545.24 | 1.121 | 998.717 | 1561.40 | 0.870 | 994.492 | 1571.36 | 0.729 |
| 0.40 | 1007.746 | 1591.37 | 1.427 | 1003.736 | 1598.21 | 1.130 | 999.003 | 1600.49 | 0.900 |
| 0.60 | 1013.528 | 1631.94 | 1.801 | 1008.868 | 1631.15 | 1.422 | 1003.582 | 1626.69 | 1.114 |
| 0.80 | 1019.138 | 1666.56 | 2.389 | 1013.787 | 1657.08 | 1.808 | 1007.931 | 1645.47 | 1.374 |
| 1.00 | 1023.473 | 1697.33 | 2.908 | 1017.594 | 1692.56 | 2.195 | 1011.331 | 1676.85 | 1.650 |
| Methanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 797.85 | 1117.85 | 0.627 | 835.697 | 1085.67 | 0.588 | 825.3641 | 1053.77 | 0.521 |
| 0.20 | 807.231 | 1129.88 | 0.754 | 842.243 | 1097.66 | 0.657 | 832.0123 | 1066.06 | 0.579 |
| 0.40 | 826.925 | 1154.36 | 0.882 | 853.222 | 1123.03 | 0.825 | 844.662 | 1091.62 | 0.747 |
| 0.60 | 846.442 | 1180.42 | 1.025 | 868.209 | 1148.76 | 0.931 | 859.694 | 1117.63 | 0.813 |
| 0.80 | 864.913 | 1206.61 | 1.230 | 880.475 | 1174.43 | 1.079 | 872.11 | 1143.51 | 0.919 |
| 1.00 | 873.826 | 1233.63 | 1.430 | 888.26 | 1202.44 | 1.221 | 880.586 | 1172.66 | 1.055 |

(Continued)

Table 2. The density, sound velocity and viscosity of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | 298.15K | | | 308.15K | | | 318.15K | | |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Density, kg/m ³ | Velocity, ms ⁻¹ | Viscosity .10 ³ Pa.s | Density, kg/m ³ | Velocity, m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s | Density kg/m ³ | Velocity m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s |
| Ethanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 803.739 | 1173.95 | 1.218 | 795.162 | 1140.45 | 0.986 | 786.548 | 1107.34 | 0.880 |
| 0.20 | 814.261 | 1184.41 | 1.455 | 805.874 | 1152.17 | 1.194 | 797.276 | 1119.29 | 1.029 |
| 0.40 | 834.755 | 1207.47 | 1.808 | 826.499 | 1174.68 | 1.471 | 818.156 | 1142.21 | 1.274 |
| 0.60 | 850.381 | 1227.86 | 2.167 | 842.826 | 1195.97 | 1.808 | 834.597 | 1163.99 | 1.506 |
| 0.80 | 870.813 | 1248.22 | 2.607 | 862.929 | 1215.86 | 2.220 | 854.509 | 1183.8 | 1.834 |
| 1.00 | 880.832 | 1269.43 | 3.202 | 872.963 | 1238.04 | 2.573 | 865.008 | 1208.0 | 2.118 |
| Propanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 814.054 | 1222.4 | 2.226 | 806.07 | 1188.63 | 1.990 | 797.914 | 1155.51 | 1.509 |
| 0.20 | 824.294 | 1231.98 | 2.516 | 816.518 | 1199.17 | 2.115 | 808.498 | 1166.36 | 1.703 |
| 0.40 | 836.027 | 1247.4 | 3.112 | 835.268 | 1216.56 | 2.611 | 826.257 | 1184.4 | 2.085 |
| 0.60 | 853.049 | 1262.22 | 3.895 | 850.786 | 1232.85 | 3.090 | 842.813 | 1201.7 | 2.386 |
| 0.80 | 870.517 | 1274.27 | 4.865 | 863.517 | 1244.26 | 3.812 | 856.003 | 1212.84 | 2.936 |
| 1.00 | 882.474 | 1288.63 | 5.964 | 875.09 | 1256.21 | 4.602 | 867.62 | 1224.98 | 3.466 |

(Continued)

Table 2. The density, sound velocity and viscosity of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | 298.15K | | | 308.15K | | | 318.15K | | |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Density, kg/m ³ | Velocity, ms ⁻¹ | Viscosity .10 ³ Pa.s | Density, kg/m ³ | Velocity, m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s | Density kg/m ³ | Velocity m.s ⁻¹ | Viscosity.10 ³ Pa.s |
| Butanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 817.139 | 1250.98 | 2.939 | 809.503 | 1217.59 | 2.279 | 801.727 | 1184.88 | 2.009 |
| 0.20 | 826.829 | 1259.51 | 3.377 | 819.371 | 1226.56 | 2.679 | 811.701 | 1193.94 | 2.328 |
| 0.40 | 845.337 | 1276.19 | 4.218 | 837.825 | 1243.61 | 3.266 | 829.718 | 1210.07 | 2.825 |
| 0.60 | 860.234 | 1288.16 | 5.410 | 853.073 | 1256.28 | 4.120 | 845.613 | 1224.73 | 3.472 |
| 0.80 | 876.417 | 1299.53 | 7.041 | 867.609 | 1266.89 | 5.087 | 860.582 | 1235.92 | 4.070 |
| 1.00 | 886.803 | 1309.16 | 8.522 | 880.293 | 1276.89 | 6.302 | 873.102 | 1245.78 | 4.956 |

$$\text{Molar compressibility } (W): W = \left(\frac{M}{\rho} \right) \kappa_s^{-1/7}$$

Where M is the apparent molecular weight of solution and can be calculated according to the following equation: $M = M_1W_1 + M_2W_2$

Where W_1 and W_2 are weight fractions of solvent and solute respectively. M_1 and M_2 are molecular weights of the solvent and solute respectively.

$$\text{Rao's molar sound function } (R_m): R_m = \left(\frac{M}{\rho} \right) U^{1/3}$$

$$\text{Van der Waals constant } (b): b = \frac{M}{\rho} \left\{ 1 - \left[\frac{RT}{MU^2} \right] \left[\sqrt{1 + \left(\frac{MU^2}{3RT} \right)} - 1 \right] \right\}$$

where R (8.3143 J K⁻¹mol⁻¹) is the gas constant and T is absolute temperature.

$$\text{Solvation number } (S_n): S_n = \frac{M_2}{M_1} \left[\frac{(100 - X)}{X} \right] \left[1 - \frac{K_s}{K_s^0} \right]$$

Where X is the number of grams of solute in 100 g of the solution. M_1 and M_2 are the molar masses and κ_s^0 and κ_s are adiabatic compressibility of pure solvent and solution respectively.

$$\text{Internal pressure } (\pi_i): \pi_i = b' RT (K\eta/U)^{1/2} (\rho^{2/3} / M^{7/6})$$

Where b' is the packing factor (=2), K is a constant (4.28×10^9) and R is gas constant (8.3143 J K⁻¹mol⁻¹).

$$\text{Free volume } (V_f): V_f = \left(\frac{MU}{K\eta} \right)^{3/2}$$

$$\text{Molar cohesive energy (MCE): } MCE = V_m \pi_i$$

Where V_m is the molar volume.

Some of these evaluated parameters are listed in tables 3 and 4.

Table 3. Some acoustical parameters such as intermolecular free path length (L_f), acoustical impedance(Z) and molar cohesive energy (MCE) of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc. mol/lit | $L_f \times 10^{11}$, m | | | | | $Z \times 10^{-6}$, kg.m ⁻² .s ⁻¹ | | | | | MCE, kJ mol ⁻¹ | | | | |
|-----------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|--|---------|---------|---------|---------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K |
| Water | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 4.32 | 4.27 | 4.24 | 1.509 | 1.526 | 1.535 | 34.06 | 31.45 | 29.46 | | | | | | |
| 0.20 | 4.24 | 4.21 | 4.19 | 1.525 | 1.540 | 1.548 | 34.64 | 31.41 | 29.62 | | | | | | |
| 0.40 | 4.11 | 4.10 | 4.10 | 1.558 | 1.570 | 1.575 | 37.76 | 34.70 | 32.00 | | | | | | |
| 0.60 | 3.99 | 4.01 | 4.03 | 1.591 | 1.600 | 1.603 | 41.54 | 38.22 | 35.03 | | | | | | |
| 0.80 | 3.90 | 3.93 | 3.97 | 1.627 | 1.633 | 1.632 | 47.10 | 42.55 | 38.50 | | | | | | |
| 1.00 | 3.82 | 3.84 | 3.89 | 1.663 | 1.666 | 1.663 | 51.32 | 46.23 | 41.67 | | | | | | |
| Methanol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 6.57 | 6.80 | 7.05 | 0.941 | 0.907 | 0.829 | 32.68 | 36.47 | 32.99 | | | | | | |
| 0.20 | 6.46 | 6.69 | 6.93 | 0.961 | 0.924 | 0.850 | 34.98 | 36.10 | 33.93 | | | | | | |
| 0.40 | 6.25 | 6.46 | 6.68 | 0.995 | 0.958 | 0.893 | 36.83 | 38.11 | 37.45 | | | | | | |
| 0.60 | 6.04 | 6.24 | 6.45 | 1.035 | 0.997 | 0.933 | 38.84 | 39.25 | 38.19 | | | | | | |
| 0.80 | 5.84 | 6.03 | 6.23 | 1.073 | 1.034 | 0.977 | 41.71 | 41.27 | 39.78 | | | | | | |
| 1.00 | 5.65 | 5.83 | 6.00 | 1.106 | 1.068 | 1.014 | 44.13 | 43.6 | 41.73 | | | | | | |
| Ethanol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 6.24 | 6.45 | 6.68 | 0.944 | 0.907 | 0.870 | 43.90 | 41.56 | 41.28 | | | | | | |
| 0.20 | 6.14 | 6.35 | 6.57 | 0.964 | 0.929 | 0.887 | 47.05 | 44.82 | 43.73 | | | | | | |

(Continued)

Table 3. Some acoustical parameters such as intermolecular free path length (L_f), acoustical impedance(Z) and molar cohesive energy (MCE) of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc. mol/lit | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K | 298.15K | 308.15K | 318.15K |
|-------------------|-------------------------|---------|---------|--|---------|---------|---------------------------|---------|---------|
| | $L_f \times 10^{11}, m$ | | | $Z \times 10^{-6}, kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ | | | MCE, kJ mol ⁻¹ | | |
| Ethanol | | | | | | | | | |
| 0.40 | 5.95 | 6.15 | 6.35 | 1.008 | 0.971 | 0.922 | 51.22 | 48.57 | 47.50 |
| 0.60 | 5.80 | 5.98 | 6.17 | 1.044 | 1.008 | 0.961 | 55.17 | 52.92 | 50.71 |
| 0.80 | 5.63 | 5.81 | 6.00 | 1.087 | 1.049 | 0.997 | 59.47 | 57.64 | 55.00 |
| 1.00 | 5.51 | 5.67 | 5.84 | 1.118 | 1.081 | 1.033 | 65.08 | 61.23 | 58.24 |
| 1-Propanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 5.95 | 6.15 | 6.36 | 0.995 | 0.958 | 0.922 | 57.58 | 57.23 | 52.37 |
| 0.20 | 5.87 | 6.06 | 6.26 | 1.016 | 0.979 | 0.943 | 60.24 | 58.03 | 54.69 |
| 0.40 | 5.73 | 5.90 | 6.10 | 1.048 | 1.016 | 0.979 | 65.82 | 63.27 | 59.37 |
| 0.60 | 5.60 | 5.77 | 5.95 | 1.083 | 1.049 | 1.013 | 72.56 | 67.85 | 62.54 |
| 0.80 | 5.47 | 5.68 | 5.85 | 1.120 | 1.074 | 1.038 | 79.97 | 74.59 | 68.65 |
| 1.00 | 5.34 | 5.59 | 5.75 | 1.155 | 1.099 | 1.063 | 87.33 | 81.17 | 73.85 |
| 1-Butanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 5.80 | 5.99 | 6.19 | 1.022 | 0.986 | 0.950 | 65.07 | 60.21 | 59.36 |
| 0.20 | 5.73 | 5.91 | 6.10 | 1.041 | 1.005 | 0.969 | 68.81 | 64.38 | 62.99 |
| 0.40 | 5.59 | 5.77 | 5.95 | 1.079 | 1.042 | 1.004 | 75.58 | 69.84 | 68.21 |
| 0.60 | 5.49 | 5.66 | 5.83 | 1.110 | 1.072 | 1.036 | 84.54 | 77.49 | 74.60 |
| 0.80 | 5.37 | 5.56 | 5.70 | 1.144 | 1.099 | 1.068 | 95.24 | 85.22 | 79.73 |
| 1.00 | 5.28 | 5.46 | 5.58 | 1.170 | 1.128 | 1.100 | 103.78 | 93.80 | 86.87 |

Table 4. Some acoustical parameters such as relaxation strength (r), Rao's molar sound function (R_m) and Van der Waals constant (b) of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | r | | | | | $R_m \cdot 10^4 \text{m}^{10/3} \cdot \text{s}^{-1/3} \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | | $b \cdot 10^5 \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|--------|--|--------|--------|---------|--------|---|--------|---------|---------|--|
| | 298.1K | 308.1K | 318.15K | 298.15K | 308.1K | 318.15K | 298.1K | 308.1K | 318.15K | 298.1K | 308.15K | 298.1K | 308.15K | 318.15K | |
| Water | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 0.0971 | 0.0740 | 0.0580 | 3.202 | 3.230 | 3.257 | 2.559 | 2.569 | 2.582 | | | | | | |
| 0.20 | 0.0673 | 0.0477 | 0.0355 | 4.337 | 4.375 | 4.413 | 3.481 | 3.498 | 3.519 | | | | | | |
| 0.40 | 0.0108 | 0.0022 | -0.0006 | 6.599 | 6.653 | 6.710 | 5.311 | 5.344 | 5.383 | | | | | | |
| 0.60 | -0.0403 | -0.0393 | -0.0336 | 8.840 | 8.911 | 8.986 | 7.112 | 7.165 | 7.227 | | | | | | |
| 0.80 | -0.0849 | -0.0726 | -0.0576 | 11.056 | 11.141 | 11.232 | 8.884 | 8.961 | 9.048 | | | | | | |
| 1.00 | -0.1254 | -0.1192 | -0.0984 | 13.273 | 13.403 | 13.514 | 10.647 | 10.753 | 10.867 | | | | | | |
| Methanol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 0.5119 | 0.5396 | 0.5662 | 5.694 | 5.723 | 5.754 | 4.943 | 4.998 | 5.061 | | | | | | |
| 0.20 | 0.5013 | 0.5294 | 0.5561 | 7.126 | 7.173 | 7.223 | 6.165 | 6.245 | 6.334 | | | | | | |
| 0.40 | 0.4795 | 0.5073 | 0.5345 | 9.808 | 9.887 | 9.968 | 8.493 | 8.618 | 8.745 | | | | | | |
| 0.60 | 0.4557 | 0.4845 | 0.5121 | 12.285 | 12.387 | 12.493 | 10.648 | 10.806 | 10.969 | | | | | | |
| 0.80 | 0.4313 | 0.4612 | 0.4892 | 14.600 | 14.713 | 14.839 | 12.680 | 12.868 | 13.063 | | | | | | |
| 1.00 | 0.4055 | 0.4352 | 0.4628 | 16.739 | 16.872 | 17.013 | 14.626 | 14.847 | 15.061 | | | | | | |

(Continued)

Table 4. Some acoustical parameters such as relaxation strength (γ), Rao's molar sound function (R_m) and Van der Waals constant (b) of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | 298.1K | 308.1K | 318.15K | 298.15K | 308.1K | 318.15K | 298.1K | 308.15K | 318.15K |
|--|--------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| | r | | | | | | | | |
| $R_m \cdot 10^4 \text{m}^{10/3} \cdot \text{s}^{-1/3} \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | | | | | | |
| $b \cdot 10^5 \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | | | | | | |
| Ethanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 0.4617 | 0.4919 | 0.5210 | 7.501 | 7.525 | 7.549 | 6.573 | 6.640 | 6.710 |
| 0.20 | 0.4520 | 0.4814 | 0.5106 | 8.829 | 8.869 | 8.909 | 7.755 | 7.843 | 7.936 |
| 0.40 | 0.4305 | 0.4610 | 0.4904 | 11.322 | 11.385 | 11.450 | 9.962 | 10.088 | 10.219 |
| 0.60 | 0.4111 | 0.4413 | 0.4708 | 13.715 | 13.788 | 13.878 | 12.073 | 12.220 | 12.386 |
| 0.80 | 0.3914 | 0.4225 | 0.4526 | 15.814 | 15.912 | 16.027 | 13.907 | 14.090 | 14.292 |
| 1.00 | 0.3705 | 0.4013 | 0.4300 | 18.094 | 18.218 | 18.351 | 15.884 | 16.100 | 16.323 |
| 1-Propanol | | | | | | | | | |
| 0.10 | 0.4163 | 0.4481 | 0.4784 | 9.258 | 9.276 | 9.297 | 8.068 | 8.141 | 8.216 |
| 0.20 | 0.4071 | 0.4383 | 0.4686 | 10.484 | 10.514 | 10.547 | 9.150 | 9.239 | 9.333 |
| 0.40 | 0.3863 | 0.4219 | 0.4520 | 12.968 | 12.856 | 12.937 | 11.326 | 11.314 | 11.464 |
| 0.60 | 0.3700 | 0.4063 | 0.4359 | 15.179 | 15.089 | 15.174 | 13.262 | 13.286 | 13.450 |
| 0.80 | 0.3537 | 0.3952 | 0.4254 | 17.215 | 17.242 | 17.332 | 15.033 | 15.193 | 15.375 |
| 1.00 | 0.3303 | 0.3836 | 0.4138 | 19.328 | 19.324 | 19.430 | 16.835 | 17.026 | 17.235 |

(Continued)

Table 4. Some acoustical parameters such as relaxation strength (r), Rao's molar sound function (R_m) and Van der Waals constant (b) of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Conc., mol/lit | r | | | | | | $R_m \cdot 10^4 \text{m}^{10/3} \cdot \text{s}^{-1/3} \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | | | $b \cdot 10^5 \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ | | | | | |
|-------------------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|--|--------|---------|--------|---------|--------|---|---------|--------|---------|---------|--|
| | 298.1K | 308.1K | 318.15K | 298.15K | 308.1K | 318.15K | 298.15K | 308.1K | 318.15K | 298.1K | 318.15K | 298.1K | 308.15K | 318.15K | 298.1K | 308.15K | 318.15K | |
| Butanol | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.10 | 0.3887 | 0.4209 | 0.4516 | 11.065 | 11.082 | 11.101 | 9.626 | 9.706 | 9.789 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | |
| 0.20 | 0.3803 | 0.4123 | 0.4432 | 12.210 | 12.236 | 12.265 | 10.630 | 10.724 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | 10.824 | |
| 0.40 | 0.3638 | 0.3959 | 0.4280 | 14.370 | 14.418 | 14.475 | 12.519 | 12.645 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | 12.785 | |
| 0.60 | 0.3498 | 0.3835 | 0.4141 | 16.444 | 16.495 | 16.563 | 14.329 | 14.475 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | 14.631 | |
| 0.80 | 0.3342 | 0.3730 | 0.3985 | 18.354 | 18.448 | 18.547 | 15.981 | 16.194 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | 16.369 | |
| 1.00 | 0.3202 | 0.3581 | 0.3801 | 20.328 | 20.366 | 20.508 | 17.687 | 17.858 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | 18.064 | |

Figures 1 and 2 show the variation of sound velocity of TBAB with concentration in water and in different solvents at different temperatures. It is clear from figures 1 and 2 that for all the solvents, sound velocity increases with increase in concentration of TBAB in all the studied solvents and temperatures. However, as temperature increases, velocity decreases.

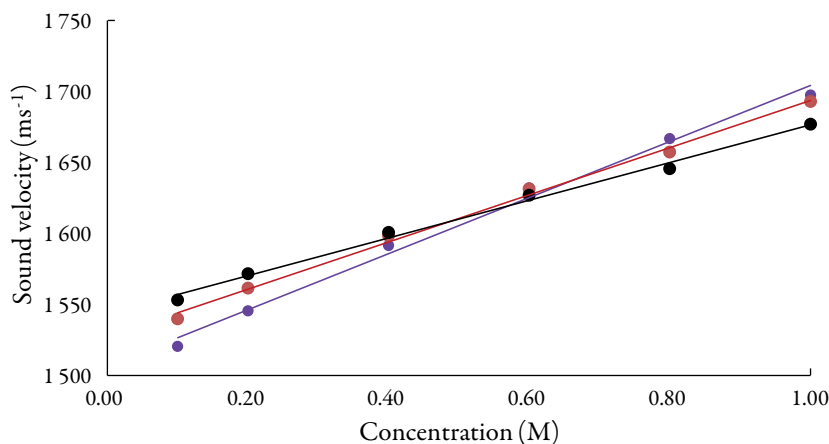


Figure 1. The variation of sound velocity of TBAB in water at different temperatures. ●: 298.15K, ●: 308.15K, ●: 318.15K.

The sound velocity is related to intermolecular free path length. It is evident from table 3 that intermolecular free path length (L_f) decreases with increase the concentration. As the name suggests, intermolecular free length is the distance between the solute and solvent molecules in a solution. At low concentrations, molecules are not so close so value of intermolecular free length is high but as concentration increases, molecules come closer and so intermolecular free length decreases. Thus, decrease in L_f suggests the decrease of distance between solute and solvent molecules due to existence of solute-solvent interactions [41].

So, when solute and solvent molecules come close to each other, velocity increases as evident from figures 1 and 2 in studied solvents. Thus, sound velocity is reverse of intermolecular free length. Thus, sound wave propagates with higher velocity in the closely packed arrangement of atoms than in the loosely packed arrangement of atoms [42, 43]. The increase of density and viscosity in solutions also indicates more attraction between solute and solvent molecules in solutions. [44]. However, when temperature increases, these interactions become weak [45] due to thermal disturbances which causes intermolecular free length to increase. This in turn, causes decrease of sound velocity with temperature.

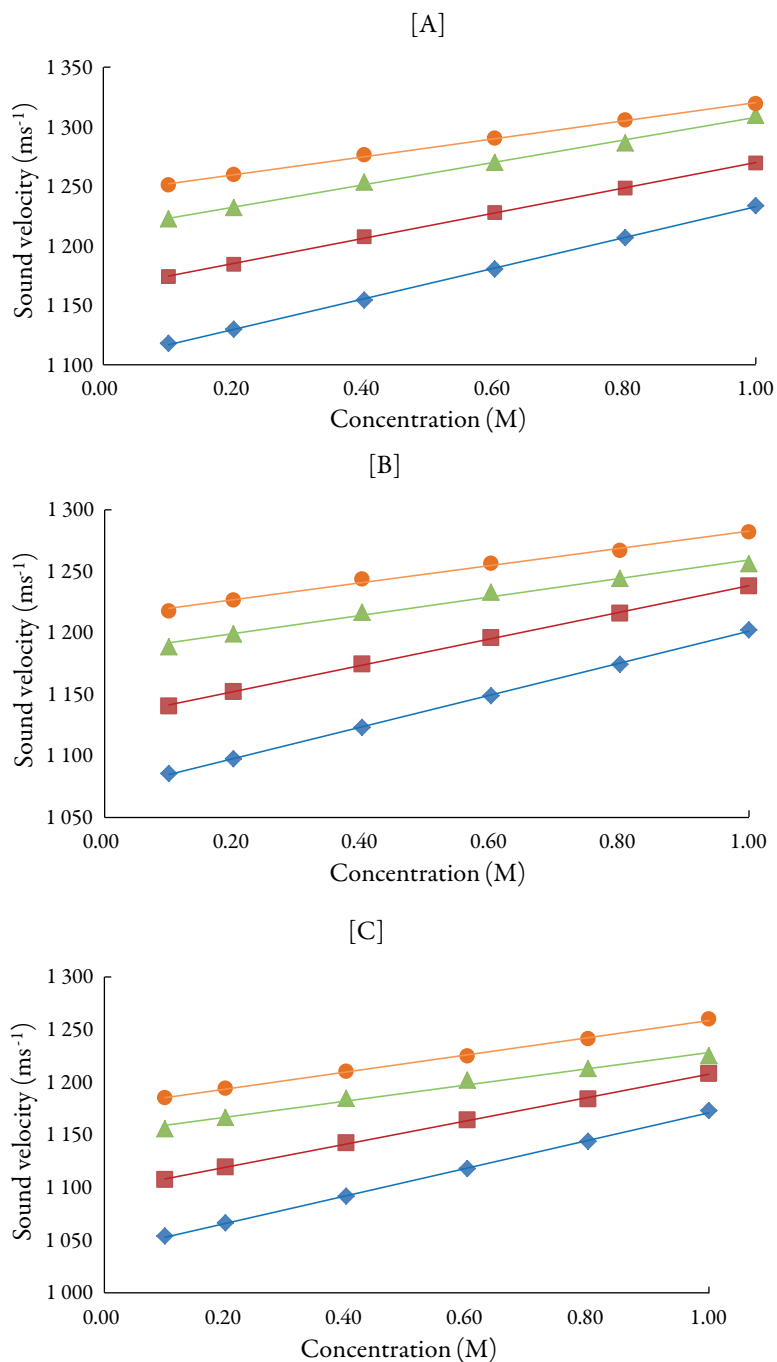


Figure 2. The variation of sound velocity of TBAB in alcohols at [A] 298.15 K, [B] 308.15K and [C] 318.15K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●).

The predominance of strong association between solute and solvents is further supported by adiabatic compressibility (κ_s). Figure 3 shows the variation of adiabatic compressibility with concentration in different solvents. For simplicity, the graphical presentation is only for 298.15 K. For other temperatures also, variation in adiabatic compressibility with concentration is of same nature.

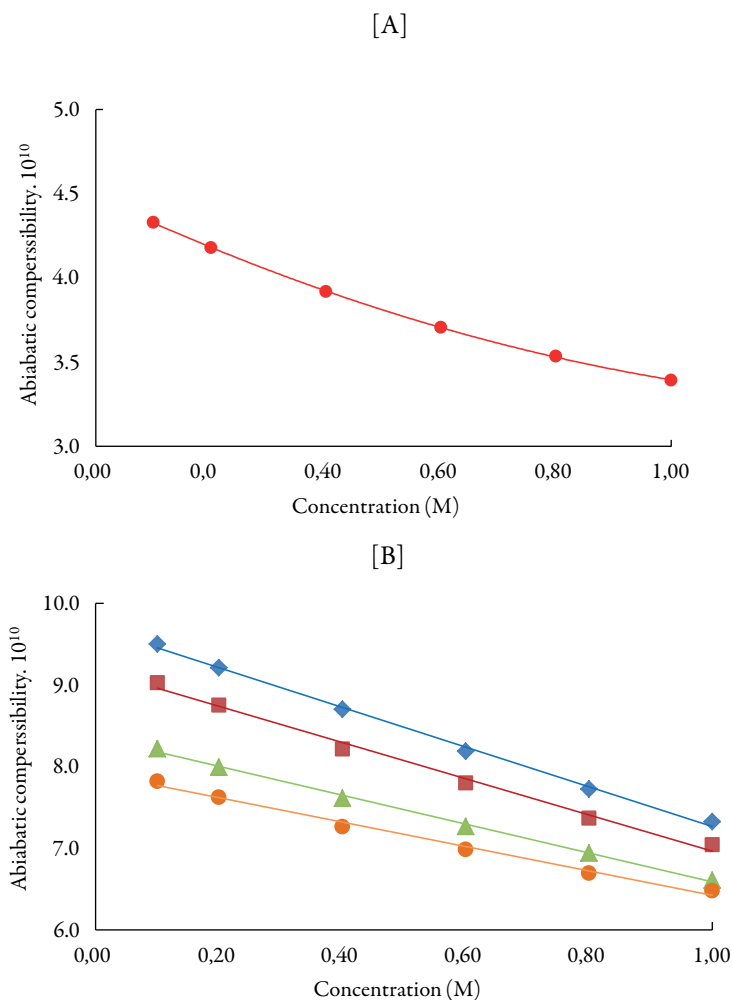


Figure 3. The variation of adiabatic compressibility (κ_s) with concentration at 298.15K [A] in water and [B] in alcohols. Methanol (\blacklozenge), ethanol (\blacksquare), propanol (\blacktriangle), butanol (\bullet) and water (\bullet).

It is observed that adiabatic compressibility (κ_s) also decreases with concentration. The decrease in adiabatic compressibility is attributed to the influence of the electrostatic

field of ions which results in aggregation of solvent molecules around solute molecule indicating strong solvent-solute interactions [46]. The adiabatic compressibility increases with increase the temperature due to increase in thermal agitation. The existence of solvent-solute interactions in studied solution is further confirmed by decrease of relaxation strength (τ) and increase of acoustical impedance (Z) with concentration as shown in tables 3 and 4. Reverse is true with increase in temperature.

Figure 4 shows the variation of molar compressibility with concentration of TBAB in studied solvents. It is observed that there is linear change increase in molar compressibility. The Van der Waals constant (b) represents the volume occupied by the molecules of a liquid. It is a useful parameter to understand the nature of interactions between the solute and solvent. Table 4 shows that Van der Waals constant (b) increases linearly with increase the concentration in all the solvent and at different temperatures and the order is: 1-butanol > 1-propanol > ethanol > methanol > water. The linear variation in Rao's molar sound function (R_m) is also observed in table 4.

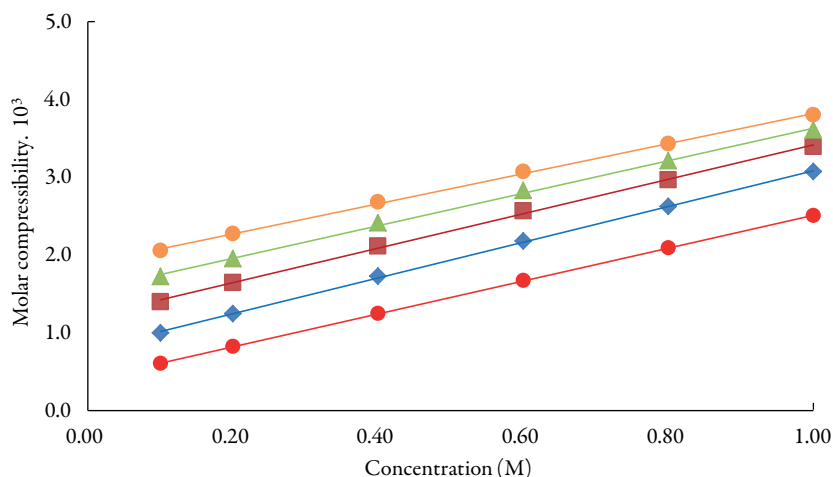


Figure 4. The variation of molar compressibility with concentration of TBAB in studied solvents at 298.15 K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●) and water (●).

The extent of linear variation of some of the acoustical parameters is given in table 5 by least square fitting equations and correlation coefficients (γ). It is observed that for most of the parameters, correlation coefficients (γ) is greater than 0.9918. The linear change in Rao's molar sound function (R_m), Van der Waals constant (b) and molar compressibility (W) suggest absence of complex formation in these solutions [47].

Table 5. The Least square equations and regression coefficients(γ) of TBAB in differentsolvents at 298.15K.

| Parameters solvents | Water | Methanol | Ethanol | 1-Propanol | 1-Butanol |
|--|--|--|--|--|--|
| $U, \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ | 197.46C + 1506.8 $\gamma = 0.993$ | 128.64C + 1104 $\gamma = 0.9996$ | 105.96C + 1163.8 $\gamma = 0.9996$ | 94.389C + 1213.5 $\gamma = 0.9973$ | 75.669C + 1244.5 $\gamma = 0.9987$ |
| $r, \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ | 0.0272C + 0.9969 $\gamma = 0.9983$ | 0.0957C + 0.7884 $\gamma = 0.9999$ | 0.0875C + 0.7973 $\gamma = 0.9915$ | 0.0765C + 0.8072 $\gamma = 0.9964$ | 0.0784C + 0.8116 $\gamma = 0.9925$ |
| $\kappa_s \cdot 10^{10}, \text{m}^2 \cdot \text{N}^{-1}$ | -1.0442C + 4.3821 $\gamma = 0.9845$ | -2.4318C + 9.6989 $\gamma = 0.9973$ | -2.2176C + 9.1815 $\gamma = 0.9928$ | -1.7703C + 8.3563 $\gamma = 0.9978$ | -1.4946C + 7.9165 $\gamma = 0.9918$ |
| $L_r \cdot 10^{11}, \text{m}$ | -0.5532C + 4.3506 $\gamma = 0.9883$ | -0.8716C + 6.4747 $\gamma = 0.9987$ | -0.8136C + 6.2983 $\gamma = 0.9953$ | -0.6754C + 6.0069 $\gamma = 0.9989$ | -0.581C + 5.8448 $\gamma = 0.9939$ |
| $R_m \cdot 10^4, \text{m}^{10/3} \cdot \text{s}^{-1/3}, \text{mol}^{-1}$ | 1.119C + 0.2103 $\gamma = 1$ | 1.218C + 0.4196 $\gamma = 0.9996$ | 1.1716C + 0.6493 $\gamma = 0.9988$ | 1.1169C + 0.8301 $\gamma = 0.9984$ | 1.0261C + 1.016 $\gamma = 0.9992$ |
| $b \cdot 10, \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ | 9E-05C + 2E-05 $\gamma = 0.9999$ | 1.0788C + 0.3711 $\gamma = 0.9994$ | 1.0302C + 0.5703 $\gamma = 0.9985$ | 0.9733C + 0.725 $\gamma = 0.9981$ | 0.8931C + 0.8847 $\gamma = 0.999$ |
| $W \cdot 10^3, \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} (\text{Nm}^2)^{1/7}$ | 2.1124C + 0.3987 $\gamma = 1$ | 2.2978C + 0.7843 $\gamma = 0.9997$ | 2.2118C + 1.201 $\gamma = 0.9989$ | 2.0905C + 1.54 $\gamma = 0.9985$ | 1.9347C + 1.8832 $\gamma = 0.9992$ |
| r | -0.2483C + 0.1157 $\gamma = 0.9845$ | -0.118C + 0.5252 $\gamma = 0.9973$ | -0.1011C + 0.4717 $\gamma = 0.9928$ | -0.0933C + 0.4255 $\gamma = 0.9978$ | -0.076 C + 0.3954 $\gamma = 0.9918$ |

The internal pressure (π_i) is the resultant of the forces of attraction and repulsion between the molecules in a liquid [48]. Cohesion creates a pressure within a liquid of value between 10^3 to 10^4 atmospheres. The important factor is that the internal pressure is sensitive to external pressure also. Figure 5 [A] shows the variation of internal pressure with concentration in all the selected solvents at 298.15 K. It is observed that internal pressure of TBAB in studied solvents is found to increase with increasing the concentration of the solutions and decrease with increase the temperature. This is because as temperature increases, there is a tendency for the ions to move away from each other, reducing the possibility for the interaction [49]. The increase in internal pressure with concentration indicates ordered structural arrangement due to molecular association between solute and solvent molecules [50].

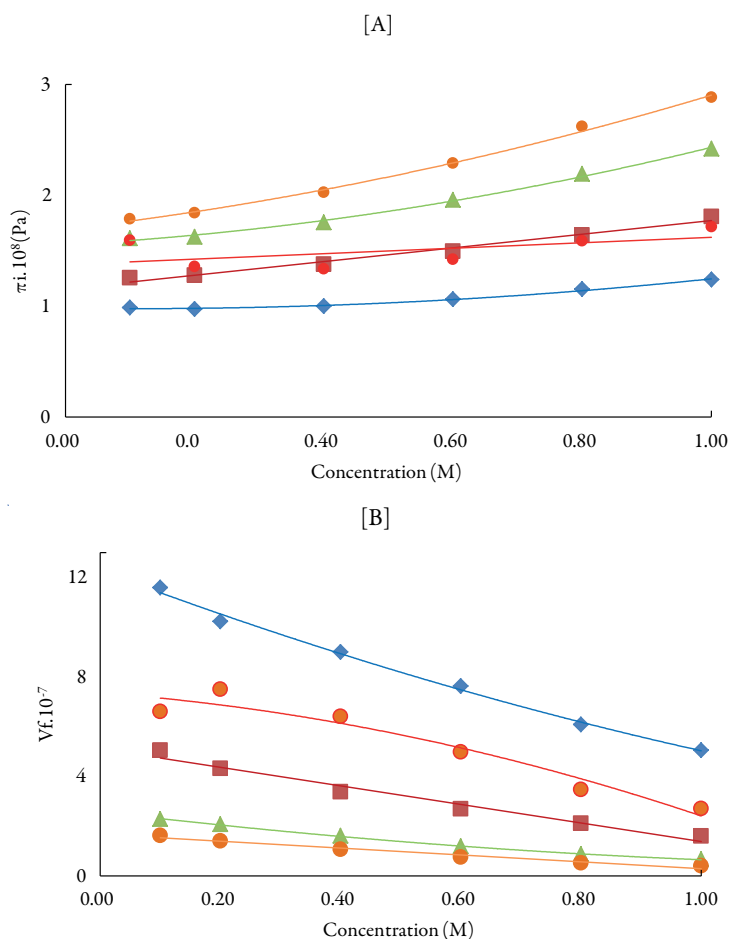


Figure 5. The variation of [A] internal pressure and [B] free volume with concentration of TBAB in studied solvents at 298.15 K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●) and water (◐).

From internal pressure, free volumes of solutions have also been evaluated. Free volume indicates the void space between the molecules i.e., the volume present due to irregular packing of molecules [48]. Figure 5 [B] shows the variation of free volume with concentration in all the selected solvents at 298.15K. It is observed that in studied solutions, free volume decreases in all the solutions indicating thereby more interaction between solute and solvent molecules, which causes compact packing [51]. The order of decrease is: 1-butanol < 1-propanol < ethanol < water < methanol. It means that it increases with increase in the chain length of alcohols due to the increase the ability of making hydrogen bonds, which decrease with increase the temperature.

Comparison of figures 5 [A] and [B] shows that free volume is inverse of internal pressure. Similar results have been reported by other workers [52]. Thus, increase in the internal pressure and decrease of free volume indicate increase the cohesive forces in the solution [53]. The increase in temperature has two opposing effects, namely structure formation (intermolecular association) and structure destruction. The structure-forming tendency is primarily due to solvent–solute interactions while destruction of the previously formed structure is due to thermal fluctuations. When the thermal energy is greater than that of interaction energy, it causes destruction of the structure previously formed [54]. As evident from results, solvent-solute interactions predominate in studied solutions.

Molar cohesive energy (MCE) is the parameter, which relates the free energy state of the liquid system to the escaping tendency. The plot of MCE vs. concentration in figure 6. It is evident from the figure that there is linear increase with concentration of TBAB in all solvents. It is observed that MCE increases with increase in concentration and decreases with increase of temperature and the order is: 1-butanol > 1-propanol > ethanol > water > methanol. The reason for slighter MCE values for water in comparison to methanol may be because of the fact that viscosity of water is higher than methanol. The overall increase of MCE with concentration confirms the enhancement of the structure-forming tendency of TBAB molecules [55].

Solvation number is another parameter, which gives the information about structure forming tendency or structure breaking tendency of a solute in solutions. The solvation number can be positive or negative. The positive solvation number suggests structure-forming tendency of solute whereas negative solvation number indicates structure-breaking tendency of solute in a solvent [56]. Figure 7 shows that for the studied solutions, solvation number values are positive at all temperatures in all solvents. The order of solvation number in studied solvents is: water > methanol > ethanol > 1-propanol > 1-butanol. The probability of ions getting closer to the solvent molecules is increased, enhancing the interactions between solute and solvent molecules [57].

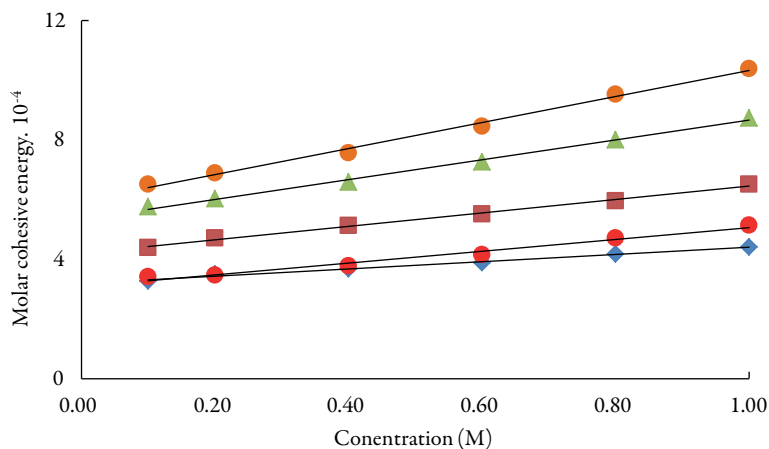


Figure 6. The variation of molar cohesive energy with concentration of TBAB studied solvents at 298.15 K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●) and water (●).

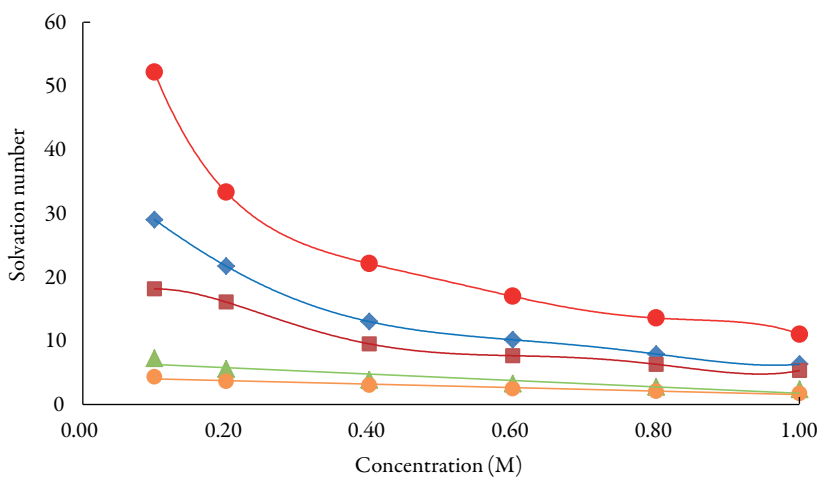


Figure 7. The variation of solvation number with concentration of TBAB in studied solvents at 298.15 K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●) and water (●).

The behaviour of a solute in a solution can also be predicted by evaluating their apparent properties. So, for studied solutions, apparent molar volume and apparent molar compressibility were evaluated at different temperatures.

The apparent molar volume (φ_V) of a solute is defined as the difference between the volume of the solution and the volume of the pure solvent per mole of solute and is given by:

$$\varphi_V = \frac{M_2}{\rho} - \frac{(\rho - \rho_0)}{m\rho\rho_0}$$

Where m denotes the number of moles of the solute per kilogram of solvent (molality), ρ and ρ_0 are densities of solution and solvent, respectively and M_2 is the molar mass of the solute. The evaluated values of apparent molar volume are listed in table 6.

Table 6. Apparent molar volume of TBAB in different solvents.

| Conc. M | Apparent molar volume. 10 ⁶ m ³ /mole | | | | |
|-----------------|---|----------|---------|------------|-----------|
| | 298.15 K | | | | |
| | Water | Methanol | Ethanol | 1-Propanol | 1-Butanol |
| 0.10 | 298.186 | 263.799 | 188.965 | 215.329 | 251.842 |
| 0.20 | 296.123 | 269.620 | 223.004 | 236.722 | 258.421 |
| 0.40 | 293.088 | 262.406 | 234.643 | 271.738 | 258.191 |
| 0.60 | 290.536 | 254.558 | 244.974 | 266.521 | 261.826 |
| 0.80 | 288.637 | 248.656 | 237.160 | 259.479 | 258.027 |
| 1.00 | 288.487 | 241.458 | 246.829 | 261.678 | 262.793 |
| 308.15 K | | | | | |
| 0.10 | 301.154 | 264.615 | 189.773 | 215.937 | 257.667 |
| 0.20 | 299.264 | 270.608 | 223.401 | 236.820 | 261.352 |
| 0.40 | 296.792 | 263.243 | 235.493 | 247.736 | 260.941 |
| 0.60 | 294.683 | 255.414 | 244.498 | 254.095 | 263.509 |
| 0.80 | 293.163 | 248.915 | 237.804 | 259.609 | 263.015 |
| 1.00 | 293.110 | 241.696 | 247.776 | 262.795 | 263.483 |
| 318.15 K | | | | | |
| 0.10 | 304.179 | 265.335 | 188.852 | 216.640 | 255.102 |
| 0.20 | 302.595 | 271.589 | 224.140 | 237.479 | 260.546 |
| 0.40 | 300.527 | 264.174 | 236.094 | 252.854 | 263.224 |
| 0.60 | 298.739 | 256.136 | 245.370 | 255.732 | 264.164 |
| 0.80 | 297.486 | 249.462 | 239.250 | 260.481 | 263.229 |
| 1.00 | 297.449 | 241.827 | 248.632 | 263.832 | 264.199 |

It is observed that apparent molar volume decreases with concentration for water and methanol whereas for ethanol, 1-propanol and 1-butanol, values increase with

concentration. The values are highest for 1-butanol, which is in agreement with that of other workers [58]. The values of apparent molar volume depend on type of salt, size of ions etc. In the present study, values of apparent molar volume are positive and large which is due to large organic ion with large intrinsic volume [58]. Further, large apparent molar volume is attributed to strong attractive interactions due to hydrogen bonding [59].

The reason for decrease of apparent molar volume with concentration in water and methanol is not clear. Hooshyar and Khezri have also reported similar decrease of apparent molar volume with concentration in binary and ternary systems [14] and the reason is not discussed. With temperature, there is slight increase in apparent molar volume in all the studied solvents.

The limiting apparent molar volume is evaluated by extrapolation of experimental apparent molar volume values using the following equation [60]:

$$\varphi_V = \varphi_V^0 - S_V C^{1/2}$$

Where C is the molar (mol/L) concentration and S_V is coefficient which is a measure of solute-solute interactions [61].

From the plot of φ_V vs. $C^{1/2}$, the values of φ_V^0 and S_V were evaluated from the intercept and slope respectively and are listed in table 7.

A relation between thermodynamics and acoustics can be obtained from the density and sound velocity measurements, which combined to calculate the apparent molar isentropic compressibility (φ_κ), by the equation:

$$\varphi_\kappa = (\kappa_S \rho_0 - \kappa_{S,0} \rho) + \frac{M_2 \kappa_S}{\rho}$$

Where M_2 is the molar mass of TBAB, κ_S and $\kappa_{S,0}$ refer to the adiabatic compressibility of the solution and solvent, respectively. The evaluated values of apparent molar compressibility are listed in table 8.

The apparent molar isentropic compressibility φ_κ values are negative in all solvents. Further, apparent molar compressibility in studied solvents increases with increase in concentration. The negative apparent molar isentropic compressibility indicates that the solvent surrounding TBAB ion would cause greater resistance to compression than the bulk, and this decreases with increase the chain length of alcohols [62]. The observed results are in agreement with other workers while studying different

Table 7. The coefficients of apparent molar properties in solutions of TBAB in different solvents at different temperatures.

| Solvent | $\Phi_V^0 \cdot 10^6$ $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ | $S_V \cdot 10^6$ $\text{m}^{9/2} \cdot \text{mol}^{-3/2}$ | $\Phi_\kappa^0 \cdot 10^{14}$ $\text{m}^5 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $S_\kappa \cdot 10^{14}$ $\text{m}^{13/2} \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
|----------------|---|--|---|---|
| 298.15K | | | | |
| Water | 302.76 (302.9)* ^{1,2} | -15.13 | -1.93 (-1.8711)* ¹ | 0.68 |
| Methanol | 281.54(286.1) | -36.59 | -7.95 | 2.95 |
| Ethanol | 180.98 | 71.26 | -6.79 | 4.17 |
| 1-Propanol | 208.78 | 63.66 | -5.44 | 2.92 |
| 1-Butanol | 250.6 | 11.68 | -4.24 | 1.95 |
| 308.15K | | | | |
| Water | 304.83 (303.15)* ¹ | -12.49 | -1.64 | 0.62 |
| Methanol | 282.88 | -37.59 | -8.71 | 4.05 |
| Ethanol | 181.56 | 71.19 | -8.73 | 4.75 |
| 1-Propanol | 203.00 | 63.71 | -6.35 | 3.51 |
| 1-Butanol | 256.56 | 7.53 | -3.91 | 1.44 |
| 318.15K | | | | |
| Water | 307.25(305.447)* ¹ | -10.46 | -1.33 | 0.50 |
| Methanol | 296.86 | -53.64 | -9.21 | 4.08 |
| Ethanol | 180.57 | 73.53 | -9.71 | 5.31 |
| 1-Propanol | 204.58 | 63.85 | -7.08 | 3.93 |
| 1-Butanol | 254.00 | 11.43 | -3.66 | 1.12 |

*1-(9), *2-[45]

quaternary ionic liquids [63]. In water and methanol, values increases with temperature whereas in other three alcohols, values decreases with temperature. Similar behavior was observed for some other electrolytes also [64].

It has been reported that large organic cation (tetra butyl ammonium) has high intrinsic compressibility as compared to the small monoatomic bromide anion. The bromide ions remain unsolvated, thus ruling out the possibility to have intrinsic compressibility. So, it is assumed that compressibility of the solution is unaffected by poor solvation of bromide ions. Further, there may be possibility of another effect where solvent molecules can penetrate into the intra-ionic free space. This is an electrostriction effect and causes constriction in the solution volume. The predominance of the penetration effect

Table 8. Apparent molar isentropic compressibility of TBAB in different solvents.

| Concentration (M), mol.l ⁻¹ | Apparent molar isentropic compressibility 10 ¹⁴ m ⁵ .N ⁻¹ .mol ⁻¹ | | | | |
|--|---|----------|---------|------------|---------|
| | 298.15K | | | | |
| | Water | Methanol | Ethanol | 1-Propanol | Butanol |
| 0.10 | -1.605 | -6.207 | -8.153 | -5.406 | -3.683 |
| 0.20 | -1.611 | -5.460 | -6.086 | -4.392 | -3.305 |
| 0.40 | -1.519 | -4.966 | -5.014 | -3.275 | -3.017 |
| 0.60 | -1.412 | -4.642 | -4.355 | -3.037 | -2.689 |
| 0.80 | -1.305 | -4.430 | -4.115 | -2.866 | -2.530 |
| 1.00 | -1.304 | -4.241 | -3.740 | -2.672 | -2.305 |
| | 308.15K | | | | |
| 0.10 | -1.330 | -9.098 | -8.973 | -5.891 | -3.145 |
| 0.20 | -1.354 | -7.081 | -6.805 | -4.871 | -3.200 |
| 0.40 | -1.248 | -5.985 | -5.534 | -4.048 | -3.078 |
| 0.60 | -1.161 | -5.414 | -4.839 | -3.592 | -2.806 |
| 0.80 | -1.064 | -5.075 | -4.533 | -3.195 | -2.606 |
| 1.00 | -1.030 | -4.824 | -4.124 | -2.928 | -2.434 |
| | 318.15K | | | | |
| 0.10 | -1.099 | -9.451 | -10.015 | -6.621 | -2.705 |
| 0.20 | -1.131 | -7.558 | -7.565 | -5.447 | -3.129 |
| 0.40 | -1.025 | -6.487 | -6.143 | -4.442 | -3.106 |
| 0.60 | -0.953 | -5.903 | -5.366 | -3.993 | -2.951 |
| 0.80 | -0.865 | -5.548 | -4.999 | -3.545 | -2.771 |
| 1.00 | -0.854 | -5.296 | -4.579 | -3.243 | -2.588 |

over the effect of intrinsic compressibility of the tetra-*n*- alkyl ammonium ions causes negative φ_x values [65]. As chain length increases, intrinsic compressibility overrides the penetration effect [66].

In case of methanol solutions, the penetration of the solvents molecules into the intra ionic free space of TBAB may be high. This may cause decrease of apparent molar isentropic compressibility with increase the concentration of the TBAB in the solution. This effect decreases with increase the chain length of alcohols.

To evaluate limiting apparent molar isentropic compressibility, the following Gucker's equation [67] was used:

$$\varphi_{\kappa} = \varphi_{\kappa}^0 - S_{\kappa} C^{\frac{1}{2}}$$

Where φ_{κ}^0 and S_{κ} are the coefficients and can be evaluated from the intercept and slope respectively from linear plots. The evaluated values of these coefficients are given in table 8.

It is evident from table 8 that all the coefficients i.e., $\varphi_{V'}^0$, $S_{V'}$, φ_{κ}^0 and S_{κ} vary systematically in alcohols from ethanol to 1-butanol. Whereas for methanol, these values are either high or low. Further, for all the studied solvents, $\varphi_{V'}^0$ values are large and positive whereas φ_{κ}^0 values are negative. As $\varphi_{V'}^0$ is a measure of solute solvent interaction, the positive value indicates strong solute solvent interactions. This suggests structure-forming tendency of TBAB in studied solvents.

The higher $\varphi_{V'}^0$ value in methanol may due to the ability of the short chain of alcohol to penetrate into the intra-ionic free space and this effect decreases with increase the concentration of TBAB in the solution. As chain length of alcohols increases from ethanol to 1-butanol, there may be possibility of hydrogen bonding, which affects interactions of TBAB with alcohols. The order is: 1-butanol > 1-propanol > ethanol. Similar result was observed by Mohammed Taghi *et al.* [62], where in methanol solutions have higher value of $\varphi_{V'}^0$ as compared to ethanolic solution. The observed $\varphi_{V'}^0$ value in water and methanol are in agreement with those observed by other workers. The values reported by these workers are given in table 8 in parenthesis.

In case of water, large organic ions may form clathrate like structure with water molecules. The tendency of making such structure decreases with increase the concentration of the TBAB. The observed values of limiting apparent molar volume for water and methanol in the present study are in agreement with those reported by other workers [68]. So, in water solutions, highest values of apparent molar volume, limiting apparent molar volume and apparent molar compressibility are observed (see table 8). Further, $\varphi_{V'}^0$ values are not much affected by the temperature.

The $S_{V'}$ values are negative for water and methanol whereas for rest of the alcohols, values are positive. The negative $S_{V'}$ means that solute-solvent interaction is stronger than solute-solute interactions. Reverse is true in other alcohols. Among alcohols, $S_{V'}$ values decrease with increase the chain length of the alcohol except in methanol. Since $S_{V'}$ is a measure of solute-solute interactions, the negative values indicate the presence of weak solute-solute interactions. Among other three alcohols, $S_{V'}$ is minimum in 1-butanol.

This again proves that magnitude of solute-solvent interactions is maximum in 1-butanol as compared to ethanol and 1-propanol.

The φ_x^0 values are negative for all the studied solvents. It is higher in water than alcohols. Among alcohols, it is maximum in 1-butanol. The negative φ_x^0 again proves existence of solute-solvent interactions in the studied solutions. In water, φ_x^0 values are less negative. This behavior can be explained by strong solute-solute interactions due to hydrophobic nature of TBAB due to which it is difficult for solvent molecules to penetrate in interionic free space. Further, negative and lower values of S_x is in agreement with the negative change in apparent molar volume values [69].

Viscosity is one of the most important factors, which affect mobility of ions/molecules. It has been reported [70, 71] that viscosity measurements are very useful in providing information regarding ion-solvent interaction, particularly as regards the modification induced by the solute on the solvent structure.

In the present study, viscosity of solutions is also found to increase with concentration. The viscosity depends on nature of solvent and intermolecular force. The viscosity of solution in different concentrations and temperatures is also affected by various molecular interactions present in solutions. The concentration and temperature dependence of viscosity coefficient of solutions also provided useful insights to the extent of ionic solvation [72]

For this, the following Jones-Dole equation [73] is used which describe the relative viscosities as a function of concentration.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + AC^{1/2} + B$$

Where η and η_0 are the viscosity coefficients of the solution and solvent respectively. A is known as Falkenhagen coefficient which reflects solute-solute interactions. The viscosity B coefficient is an empirical parameter, which gives information regarding solute-solvent interactions. B parameter is related to the size of solute and molar volume of the solvent [74, 75]. Thus, B values reflect the net structural effects of the solute and solvent molecules.

It is observed that A is negative for all the selected solvents and is very small as compared to coefficient B , which suggests that there is a weak ion-ion interaction. It is reported that for organic electrolytes, A value can be neglected at moderate or high concentrations [75, 76]. So, above equation is simplified as:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + BC$$

The value of coefficient B can be obtained from the slope of linear plot of $(\eta/\eta_0 - 1)$ vs. C . Table 9 shows the values of B for all the solutions. The values of the B coefficient for all studied solvents at all studied temperatures are positive, indicating that the solute solvent interactions are strong [77, 78] so TBAB ions behave as structure makers. Further, as temperature increases, B values decrease. Further, as number of carbon atoms increases in alcohols, B -coefficient increase.

Table 9. The coefficient B of Jones-Dole equation for solutions of TBAB in studied solvents at different temperatures.

| Solvents | 298.15K | 308.15K | 318.15K |
|------------|---------|---------|---------|
| Water | 2.389 | 1.750 | 1.228 |
| Methanol | 1.566 | 1.269 | 1.046 |
| Ethanol | 1.978 | 1.632 | 1.271 |
| 1-Propanol | 2.160 | 1.521 | 1.119 |
| 1-Butanol | 2.439 | 1.711 | 1.248 |

Some thermodynamic parameters such as enthalpy (ΔH^*), Gibbs free energy (ΔG^*) and entropy (ΔS^*) have also been evaluated from acoustic data by the following equations [76, 77]:

$$\Delta G^* = RT \ln \left(\frac{\eta V_m}{h N_A} \right)$$

$$\left(R \ln \left(\frac{\eta V_m}{h N_A} \right) = \frac{\Delta H^*}{T} - \Delta S^* \right)$$

Where R is the gas constant, h is Plank constant, N_A is Avogadro number, V_m is the molar volume, and η is the viscosity.

The enthalpy and entropy can be evaluated from the slope and intercept of the plot of

$$R \ln \left(\frac{\eta V_m}{h N_A} \right) \text{ vs. } 1/T.$$

The evaluated enthalpy and entropy values are reported in table 10. It is observed enthalpy values are positive whereas entropy are negative. The positive enthalpy

suggests endothermic process in studied solutions. The negative entropy indicates that formation of the transition state is associated with an increase in order relative to the initial state [76, 77]. This is expected when the free volume in the liquid has to be rearranged in order to provide sufficient space to the moving particles for jumping from their initial position to the activated transition state. The positive Gibbs energy of flow suggest that the process is non-spontaneous.

Table 10. The variation of the enthalpy and entropy with concentration in different solvents.

| Enthalpy, kJ.mol ⁻¹ | | | | | |
|--|---------|----------|---------|------------|-----------|
| Conc., mol/l | Water | Methanol | Ethanol | 1-Propanol | 1-Butanol |
| 0.10 | 15.194 | 6.0178 | 11.647 | 14.066 | 13.924 |
| 0.20 | 16.276 | 9.1973 | 12.513 | 14.247 | 13.648 |
| 0.40 | 17.411 | 5.508 | 12.704 | 14.957 | 14.767 |
| 0.60 | 18.106 | 8.0999 | 13.296 | 18.418 | 16.065 |
| 0.80 | 20.885 | 10.442 | 12.811 | 18.816 | 20.467 |
| 1.00 | 21.364 | 11.009 | 15.25 | 20.264 | 20.321 |
| Entropy, J.K ⁻¹ mol ⁻¹ | | | | | |
| 0.10 | -168.73 | -199.35 | -186.13 | -183.43 | -185.94 |
| 0.20 | -167.40 | -190.76 | -185.14 | -183.96 | -188.26 |
| 0.40 | -166.47 | -204.67 | -186.33 | -183.40 | -186.27 |
| 0.60 | -166.32 | -197.17 | -185.85 | -173.50 | -183.80 |
| 0.80 | -159.40 | -190.68 | -188.87 | -173.84 | -171.13 |
| 1.00 | -159.47 | -189.82 | -182.23 | -170.56 | -173.14 |

Figure 8 shows the variation of Gibbs free energy with concentration. It is observed from figure 8 that Gibbs free energy values are positive and increases linearly with increase in temperature and concentration of TBAB in all solvents. The positive Gibbs free energy may be attributed to specific interactions like hydrogen bonding and charge transfer [78, 79]. The increase of Gibbs free energy suggests closer packing of the molecules due to bonding of unlike molecules in the solutions [80]. The increase in Gibbs free energy with temperature suggests that more time is required for the cooperative process or the rearrangement of molecules in the solution.

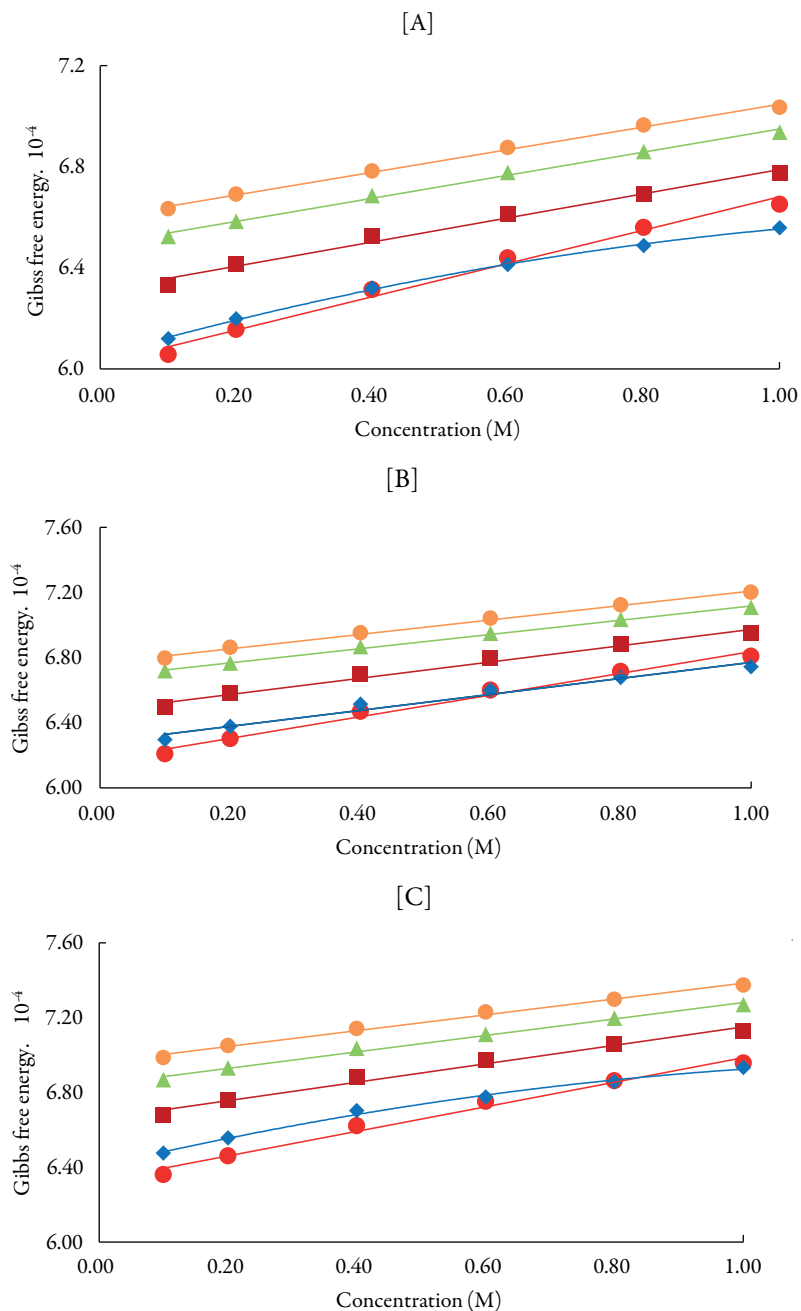


Figure 8. The variation of Gibbs free energy with concentration of TBAB in different solvents at [A] 298.15 K, [B] 308.15 K and [C] 318.15 K. Methanol (♦), ethanol (■), propanol (▲), butanol (●) and water (●).

Comparison of Gibbs free energy values between alcohols shows as chain length increases, Gibbs free energy increases i.e., order is: butanol>propanol>ethanol>methanol> water. The result ΔH^* and ΔG^* were positive while the ΔS^* are negative at all concentrations indicating thereby presence of specific interaction between the solute and solvents. It has been reported that positive Gibbs free energy mostly causes endothermic type of reactions [81-89].

Thus, it is concluded that in all the studied solutions, solute-solvent interactions exist and the magnitude of these interactions vary in different solvents. However, when temperature increases, these interactions become weak due to thermal disturbances. The solute-solvent interactions increase with increase in the chain length of alcohols due to the increase the ability of making hydrogen bonds, which decrease with increase the temperature. The specific interaction between the solute and solvents is again confirmed by negative entropy. The positive enthalpy suggests endothermic process in studied solutions. Whereas positive Gibbs energy of flow suggest that the process is non-spontaneous.

ACKNOWLEDGEMENT

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

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. Z. Wei, X. Wei, Xiuhong, Z. Wang, J. Liu, Ionic liquid crystals of quaternary ammonium salts with a 2-hydroxypropoxy insertion group, *J. Mater. Chem.*, **21**,6875-6882 (2011).
2. J.I. Kadokawa, *Ionic Liquids-New Aspects for the Future*, InTech, 2013.
3. A. Stojanovic, C. Morgenbesser, D. Kogelnig, R. Krachler, B.K. Keppler, *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches*, A. Kokorin (Ed.), Intech Open, 2011.

4. R.T. Carson, E. Larson, S.B. Levy, B.M. Marshall, A.E. Aiello, Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community, *J. Antimicrob. Chemother.*, **62**, 1160-1162 (2008).
5. H. Kleszczyńska, S. Matyjasik, J. Sarapuk, D. Grobelny, S. Witek, Interaction of some quaternary ammonium salts with red cells and planar lipid membranes, *Studia Biophys.*, **84**, 173-178 (1981).
6. B. Dmochowska, K. Sikora, A. Woziwodzka, J. Piosik, B. Podgórska, Mutagenic activity of quaternary ammonium salt derivatives of carbohydrates, *Beilstein J. Org. Chem.*, **12**, 1434-1439 (2016).
7. S.P.V. Vladimi, E. Yanenko, I. Krossing, R. Kalb, Thermochemistry of ammonium based ionic liquids: Tetra-alkyl ammonium nitrates. Experiments and computations, *J. Chem. Thermodyn.*, **51**, 107-113 (2012).
8. E.R. Nightingale Jr., Viscosity of aqueous solutions. III. Tetramethylammonium bromide and the role of the tetraalkylammonium ions, *J. Phys. Chem.*, **66**, 894-897 (1962).
9. S. Lindenbaum, G.E. Boyd, Osmotic and activity coefficients for the symmetrical tetraalkylammonium halides in aqueous solution at 25°C, *J. Phys. Chem.*, **68**, 911-917 (1964).
10. B.J. Levien, Some physical properties of aqueous solutions of tetramethylammonium bromide and tetramethylammonium iodide, *Aust. J. Chem.*, **18**, 1161-1170 (1965).
11. H.S. Frank, W.Y. Wen, Ion-solvent interaction. Structural aspects of ion-solvent interaction in aqueous solutions: a suggested picture of water structure, *Disc. Faraday Soc.*, **24**, 133-140 (1957).
12. H. Ruterjans, F. Schreiner, U. Sage, T. Ackermann, Apparent molal heat capacities of aqueous solutions of alkali halides and alkylammonium salts, *J. Phys. Chem.*, **73**, 986-994 (1969).
13. A.K. Covington, T. Dickinson, *Physical chemistry of organic solvent systems*, Plenum, New York, 1973.
14. H. Hooshyar, B. Khezri, Volumetric properties of tetra-*n*-butyl ammonium bromide in aqueous solutions of magnesium sulphate in the temperature range 298.15 to 318.15K and under the atmospheric pressure, *Phys. Chem. Liq.*, **54**, 663-679 (2016).

15. Z.B. Zhou, H. Matsumoto, K. Tatsumi, Low-melting, low-viscous, hydrophobic ionic liquids: aliphatic quaternary ammonium salts with perfluoroalkyl trifluoroborates, *Chem., Eur. J.*, **11**, 752-766 (2005).
16. J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Room-temperature molten salts based on the quaternary ammonium ion, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8858-8864 (1998).
17. D.Z. Xu, Y. Liu, S. Shi, Y. Wang, Chiral quaternary alkylammonium ionic liquid [Pro-dabco] [BF₄]: as a recyclable and highly efficient organocatalyst for asymmetric Michael addition reactions, *Tetrahedron: Asymmetry*, **21**, 2530-2534 (2010).
18. S. Han, J. Li, S. Zhu, R. Chen, Y. Wu, X. Zhang, Z. Yu, Potential application of ionic liquid in wood related industries, *BioResources*, **4**, 825-834 (2009).
19. C.P. Gerba, Quaternary ammonium biocides: efficacy in application, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 464-469 (2015).
20. D. Zhao, M. Wu, Y. Kou, E. Min, Ionic liquids: applications in catalysis, *Catalysis Today*, **74**, 157-189 (2002).
21. G. Cheng, Z. Zhang, S. Chen, J.D. Bryers, S. Jiang, Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces, *Biomaterials*, **28**, 4192-4199 (2007).
22. B.C. Ranu, A. Das, S. Samanta, Catalysis by an ionic liquid: efficient conjugate addition of thiols to electron deficient alkenes catalyzed by molten tetrabutylammonium bromide under solvent-free conditions, *Tetrahedron*, **59**, 2417-2421 (2003).
23. S. Mallakpour, A. Zadehnazari, Synthesis and characterization of novel heat stable and processable optically active poly(amide-imide) nanostructures bearing hydroxyl pendant group in an ionic green medium, *J. Polym. Environ.*, **21**, 132-140 (2013).
24. B. Guo, E. Duan, A. Ren, Y. Wang, H. Liu, Solubility of SO₂ in caprolactam tetrabutyl ammonium bromide ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 1398-1401 (2010).
25. T. Floris, P. Kluson, L. Bartek, H. Pelantova, Quaternary ammonium salts ionic liquids for immobilization of chiral Ru-BINAP complexes in asymmetric hydrogenation of β -ketoesters, *Appl. Catalysis*, **366**, 160-165 (2009).

26. K. Kim, C. Lang, R. Moulton, P.A. Kohl, Electrochemical investigation of quaternary ammonium/aluminum chloride ionic liquids, *J. Electrochem. Soc.*, **151**, A1168-A1172 (2004).
27. M.I. Levinson, Rinse-added fabric softener technology at the close of the twentieth century, *J. Surfactants Deterg.*, **2**, 223-235(1999).
28. S. Sowmiah, V. Srinivasadesikan, M.C. Tseng, Y.H. Chu, On the chemical stabilities of ionic liquids, *Molecules*, **14**, 3780-3813 (2009).
29. J.M. Khurana, S. Kumar, Tetrabutylammonium bromide (TBAB): a neutral and efficient catalyst for the synthesis of biscoumarin and 3,4-dihydropyrano[*c*]chromene derivatives in water and solvent-free conditions, *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4125-4127 (2009).
30. L.W. Xu, J.W. Li, S.L. Zhou, C.G. Xia, A green, ionic liquid and quaternary ammonium salt-catalyzed aza-Michael reaction of α,β -ethylenic compounds with amines in water, *New J. Chem.*, **28**, 183-184 (2004).
31. A.U. Mandakmare, M.L. Narwade, D.T. Tayade, A.B. Naik, Intermolecular interactions in dioxane-water solutions of substituted coumarins according to ultrasonic data, *Russ. J. Phys. Chem.*, **88**, 2334-2338 (2014).
32. O. Mokate, W.A.A. Ddamba, Volumetric properties of (difurylmethane+alkan-1-ol) binary mixtures at 298.15 K, *J. Soln. Chem.*, **35**, 1493-1503 (2006).
33. S. Canzonieri, A. Camacho, R. Tabarsrozzi, M. Postigo, L. Mussari, Volumetric and viscous behaviour of the binary and ternary systems formed by methyl acetate, ethyl acetate and 1-propanol at 283.15, 298.15 and 313.15 K, *Phys. Chem. Liq.*, **50**, 530-545 (2012).
34. B. Goddu, M.M. Tadavarthi, V.K. Tadekoru, J.N. Guntupalli, Density, speed of sound, and dynamic viscosity of 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and *N*-methylaniline binary systems from $T = 298.15$ to 323.15 K at 0.1 MPa, *J. Chem. Eng. Data*, **64**, 2303-2319(2019).
35. D.S. Gill, D.S. Rana, S.P. Jauhar, Compressibility studies of some copper(I), silver(I), and tetrabutylammonium salts in acetonitrile + adiponitrile binary mixtures, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 2066-2071 (2010).

36. F. Hirata, K. Arakawa, Ultrasonic study of solute-solvent interaction in aqueous solutions of tetraalkylammonium salts, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **45**, 2715-2719 (1972).
37. J.A. Riddick, W.B. Bunger, T. Sakano, *Organic Solvents: Physical Properties and methods of purification*, 4thEd., Techniques of Chemistry, II, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley, New York, 1986.
38. S. Baluja, R.M. Talaviya, Density, sound speed, and viscosity of dihydropyridine derivatives in dimethyl sulfoxide at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, **61**, 1431-1440 (2016).
39. B. Hemalatha, P. Vasantharani, N. Senthikumar, Solute-solvent interactions of TBAB in DMF-water system at different temperatures, *Int. J. Adv. Eng. Tech.*, **6**, 795-803 (2013).
40. A. Toumi, N.E. Hammami, M. Bouanz, Acoustic and thermodynamic study of binary mixture cyclohexane-methanol using ultrasonic interferometer at different temperatures, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **56**, 461-467 (2018).
41. S.S. Kulkarni, U.V. Khadke, Effect of solvents on the ultrasonic velocity and acoustic parameters of polyvinylidene fluoride solutions, *Ind. J. Mat. Sci.*, **2016**, ID 9582582 p. 1-6 (2016).
42. S.G. Rao, T.M. Mohan, T.V. Krishna, B.S. Rao, Volumetric properties of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and 2-pyrrolidone from $T = (298.15 \text{ to } 323.15) \text{ K}$ at atmospheric pressure, *J. Chem. Thermodyn.*, **94**, 127-137 (2016).
43. M.S. Raman, M. Kesavan, K. Senthilkumar, V. Ponnuswamy, Ultrasonic, DFT and FT-IR studies on hydrogen bonding interactions in aqueous solutions of diethylene glycol, *J. Mol. Liq.*, **202**, 115-124 (2015).
44. D.R. Godhani, P.B. Dobariya, A.M. Sanghani, A.A. Jogel, J.P. Mehta, Effect of temperature and solvents on thermo-physical properties of 1,3,4-oxadiazole derivative at atmospheric pressure, *J. Mol. Liq.*, **180**, 179-186 (2013).
45. S. Ravichandran, K. Ramanathan, Ultrasonic investigations of MnSO_4 , NiSO_4 and CuSO_4 aqueous in polyvinyl alcohol solution at 303K, *Rasayan J. Chem.*, **3**, 375-384 (2010).
46. D.R. Godhani, P.B. Dobariya, A.M. Sanghani, Effect of temperature and solvents on ultrasonic velocity and thermodynamic parameters of 1,3,4-oxadiazole derivative solutions, *J. Mol. Liq.*, **168**, 28-35 (2012).

47. V. Kannappan, R.J. Santhi, Ultrasonic study of induced dipole-dipole interactions in binary liquid mixtures, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **43**, 750-754 (2005).
48. P. Sharma, S. Chauhan, M.S. Chauhan, V.K. Syal, Ultrasonic velocity and viscosity studies of tramacip and parvodex in binary mixtures of alcohol + water, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **46**, 839-843 (2008).
49. S. Punitha, R. Uvarani, A. Panneerselvam, Acoustical and Spectroscopic studies in aqueous solutions of polymer and dextrin's binary complex formation, *Int. J. ChemTech Res.*, **7**, 629-638 (2014).
50. M. Kazafi, H.R. Ansari, Acoustical behavior of glucose. Sucrose and maltose in aqueous ammonium chloride solutions (0.5M) at different temperature, *Res. Paper. Chem.*, **1**, 1-4 (2011).
51. K.R. Devi, S. Geetha, Ultrasonic analysis of intermolecular interaction through internal pressure and free volume of aqueous fertilizer solutions, *Int. J. ChemTech Res.*, **8**, 519-526 (2015).
52. S. Punitha, R. Uvarani, A. Panneerselvam, S. Nithiyantham, Physico-chemical studies on binary aqueous solutions of Anti-Viral Influenza drugs, *Heliyon*, **5**, e01941 (2019).
53. B.B. Dhaduk, C. B. Patel, P. H. Parsania, Ultrasonic speed and related thermo-acoustical parameters of solutions of 1,1'-bis(3-methyl-4-ethoxyacetylphenoxy) cyclohexane at four different temperatures, *J. Soln. Chem.*, **44**, 1976-1996 (2015).
54. P. S. Nikam, M. Hasan, T.B. Pawar, A.B. Sawant, Ultrasonic velocity and allied parameters of symmetrical tetraalkyl ammonium bromides in aqueous ethanol at 298.15 K, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **42**, 172-178 (2004).
55. M.R. Sanaria, P.H. Parsania, Studies on sound velocity and acoustical parameters of epoxy resins based on bisphenol-C, *J. Pure Appl. Ultrason.*, **22**, 54-59 (2000).
56. S. Khan, R. Sharma, A.K. Sharma, Acoustic studies and other acoustic parameters of Cu (II) soap derived from non-edible neem oil (*AzadiractaIndica*), in non-aqueous media at 298.15 K, *Acta Acustica*, **104**, 277-283 (2018).
57. D.R. Bharja, Y.V. Patel, P.H. Parsania, Ultrasonic study of poly (R, R', 4, 4'-cyclohexylidene diphenylene phosphorochlorid-ate)-DMF solutions at different temperatures, *J. Pure Appl. Ultrason.*, **24**, 47-53 (2002).

58. J. Krakowiak, Apparent molar volumes and compressibilities of tetrabutylammonium bromide in organic solvents, *J. Chem. Thermodyn.*, **43**, 882-894 (2011).
59. R. Sadeghi, R. Golabiazar, M. Zlaili, Vapor-liquid equilibria, density, speed of sound, and refractive index of sodium tungstate in water and in aqueous solutions of poly(ethyleneglycol) 6000, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 125-133 (2010).
60. D.O. Mason, XXVIII. Solute molecular volumes in relation to solvation and ionization, *Philosoph. Mag.*, **8**, 218-235 (1929).
61. R. Gopal, M.A. Siddiqi, Study of ion-solvent interaction of some tetraalkylammonium and common ions in N-methylacetamide from apparent molal volume data, *J. Phys. Chem.*, **73**, 3390-3394 (1969).
62. M.T.Z. Moattar, H. Shekaari, Apparent molar volume and isentropic compressibility of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide in water, methanol, and ethanol at $T = (298.15 \text{ to } 318.15) \text{ K}$, *J. Chem. Thermodyn.*, **37**, 1029-1035 (2005).
63. R.L. Gardas, D.H. Dagade, J.A.P. Coutinho, K.J. Patil, Thermodynamic Studies of Ionic Interactions in Aqueous Solutions of Imidazolium-Based Ionic Liquids [Emim][Br] and [Bmim][Cl], *J. Phys. Chem. B*, **112**, 3380-3389 (2008).
64. P.J. Victor, B. Das, D.K. Hazra, Ultrasonic velocities and isentropic compressibilities of electrolytes in 2-methoxyethanol from 15 to 35°C, *J. Soln. Chem.*, **30**, 435-442 (2001).
65. D. Das, B. Das, D.K. Hazra, Ultrasonic velocities and isentropic compressibilities of some symmetrical tetraalkylammonium salts in *N,N*-dimethylacetamide at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **111**, 15-18 (2004).
66. J. Krakowiak, W. Grzybkowski, Apparent molar volume and compressibility of tetrabutylphosphonium bromide in various solvents, *J. Chem. Eng. Data.*, **55**, 2624-2629 (2010).
67. F.T. Gucker, The apparent molal heat capacity, volume, and compressibility of electrolytes, *Chem. Rev.*, **13**, 111-130 (1933).
68. N. Saha, B. Das, Apparent molar volumes of some symmetrical tetraalkylammonium bromides in acetonitrile at (298.15, 308.15, and 318.15) K, *J. Chem. Eng. Data*, **42**, 227-229 (1997).

69. P.S. Naidu, K.R. Prasad, Ultrasonic velocity and allied parameters of cypermethrin with xylene and ethanol, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **42**, 512-517 (2004).
70. S.K. Sharma, G. Singh, H. Kumar, R. Kataria, Thermodynamic study of N-acetyl glycine in aqueous tetraethylammonium iodide solutions in the temperature interval (288.15 to 308.15) K: Volumetric and acoustic study, *J. Chem. Thermodyn.*, **94**, 74-84 (2016).
71. Y. Zhao, H. Liu, Z. Min, J. Wang, Volumetric and viscosity properties for tetraalkylammonium bromides and some ions in PC+THF mixtures at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **223**, 1172-1177 (2016).
72. H. Donald, B. Jenkins, Y. Marcus, Viscosity B-coefficients of ions in solution, *Chem. Rev.*, **95**, 2695-2724 (1995).
73. G. Jones, M. Dole, The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 2950-2964 (1929).
74. R.S. Patil, V.R. Shaikh, P.D. Patil, A.U. Borse, K.J. Patil, The viscosity B and D coefficient (Jones–Dole equation) studies in aqueous solutions of alkyl trimethylammonium bromides at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **200**, 416-424 (2014).
75. H. Shekaari, M.T.Z. Moattar, S.N. Mirheydari, Density, viscosity, speed of sound, and refractive index of a ternary solution of aspirin, 1-butyl-3-methylimidazolium bromide, and acetonitrile at different temperatures $T = (288.15 \text{ to } 318.15) \text{ K}$, *J. Chem. Eng. Data*, **60**, 1572-1583 (2015).
76. E. Tyunina, V. Afanas'ev, M. Chekunova, Viscosity and density of solutions of tetra ethyl ammonium tetrafluoroborate in propylene carbonate at different temperatures, *J. Soln. Chem.*, **41**, 307-317(2012).
77. T. Zhao, Q. Xu, J. Xiao, X. Wei, Excess properties and spectroscopic studies for binary system of polyethylene glycol 200 (1) + dimethyl sulfoxide (2) at $T = (298.15 \text{ to } 318.15) \text{ K}$, *J. Chem. Eng. Data*, **60**, 2135-2145 (2015).
78. T. Ramanujappa, J.A. Bhavani, E.R. Gopal, N.M. Murthi, Excess sound velocity and excess specific acoustic impedance of (2,2,2-trifluoroethan-1-01 + benzene), (benzene+dimethylsulphoxide) and (2,2,2-trifluoroethan-1-01+dimethyl sulphoxide) at 298.15 K, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **38**, 301-305 (2000).
79. A. Ali, S. Hyder, A. K. Nain, Intermolecular interactions in ternary liquid mixtures by ultrasonic velocity measurements, *Ind. J. Phys.*, **74B**, 63-67 (2000).

80. A.B. Naik, Densities, viscosities, speed of sound and some acoustical parameter studies of substituted pyrazoline compounds at different temperatures, *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, **53**, 27-34 (2015).
81. N.J. Madhuri, P.S. Naidu, J. Glory. K.R. Prasad, Ultrasonic investigations of molecular interaction in binary mixtures of benzyl benzoate with acetonitrile and benzonitrile, *E-J. Chem.*, **8**, 457-469 (2011).
82. U. Domanska, M. Królikowska, Density and viscosity of binary mixtures of thiocyanate ionic liquids + water as a function of temperature, *J. Soln. Chem.*, **41**, 1422-1445 (2012).
83. M.G. Landge, S.S. Badade, B.V. Kendre, Density, ultrasonic velocity and viscosity measurements of glucose-alcohol-water mixtures at various temperatures, *Int. J. Res. Chem. Environ.*, **3**, 348-352 (2013).
84. S.S. Bittencourt, H.E. Hoga, R.B. Torres, J.V.H. Angelo, Thermodynamic and spectroscopic properties of binary mixtures of *n*-butylammonium butanoate ionic liquid with alcohols at $T = (293.15-313.15)$ K, *J. Chem. Thermodyn.*, **105**, 238-252 (2017).
85. M.B. Gramajo de Doz, A.M. Cases, C.M. Bonatti, H.N. Sólamo, Influence of temperature on the (liquid + liquid) equilibria of {3-methyl pentane + cyclopentane + methanol} ternary system at $T = (293.15, 297.15, \text{ and } 299.15)$ K, *J. Chem. Thermodyn.*, **41**, 1279-1283 (2009).
86. M. Hasan, A.P. Hiray, U.B. Kadam, D. F. Shirude, K.J. Kurhe, A.B. Sawant, Densities, viscosities, speeds of sound, FT-IR and $^1\text{H-NMR}$ studies of binary mixtures of *n*-butyl acetate with ethanol, propan-1-ol, butan-1-ol and pentan-1-ol at 298.15, 303.15, 308.15 and 313.15 K, *J. Soln. Chem.*, **40**, 415-429 (2011).
87. A.K. Nain, Ultrasonic and viscometric study of molecular interactions in binary mixtures of aniline with 1-propanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, and 2-methyl-2-propanol at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **259**, 218-227 (2007).
88. Y. Xu, J. Yao, C. Wang, H. Li, Density, viscosity, and refractive index properties for the binary mixtures of *n*-butylammonium acetate ionic liquid + alkanols at several temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, **57**, 298-308 (2012).
89. U. Domanska, M. Zawadzki, A. Effect Królikowska, Effect of temperature and composition on the density, viscosity, surface tension, and thermodynamic properties of binary mixtures of *N*-octylisoquinoliniumbis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide with alcohols, *J. Chem. Thermodyn.*, **48**, 101-111 (2012).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

S. Baluja, E.A.M. Alnayab, Volumetric behaviour of tetra-*n*-butyl ammonium bromide in various solvents at different temperatures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 722-761 (2019).

Potentialities of the Colombian propolis in pharmaceuticals and cosmetics: A standpoint from the quality control

Yuly Ximena Correa-González¹, Maritza Adelina Rojas-Cardozo², Claudia Elizabeth Mora-Huertas¹

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

²Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia UN (GIFFUN). Ciudad Universitaria, Carrera 30 45-03, edificio 450, código postal 111321. Sede Bogotá, Colombia

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

Received: July 8, 2019

Accepted: October 4, 2019

SUMMARY

Propolis is a hive product made by bees from vegetable exudates that are mixed with their secretions. The value of this material is established in terms of the content of biologically active molecules, that analytically is represented by parameters such as ethanol-soluble compounds (resins), oxidation index, phenolic compounds and total content of flavonoids. On the contrary, if propolis has a high percentage of waxes, mechanic impurities or heavy metals, it is classified as a sub-standard beekeeping product. On this basis, this research work illustrates the use of quality control as a strategy to identify the possible application of two samples of Colombian propolis for developing innovative pharmaceutical and cosmetic formulations. The results evidence that the investigated samples are low-quality propolis because of their high waxes content. However, far from being a disadvantage, these waxes could generate added value when they are incorporated, for example, in products requiring lipid components as nano and microparticulate systems or nanofibrous composite scaffolds and films.

Key words: Propolis, bee products, quality control, pharmaceuticals, cosmetics.

RESUMEN

Potencialidad de los propóleos colombianos en farmacia y cosmética: un punto de vista desde el control de calidad

El propóleo es un producto de las colmenas elaborado a partir de la mezcla de exudados vegetales con las secreciones de las abejas. La calidad de este material es definida en términos del contenido de moléculas bioactivas, que analíticamente es reportado como compuestos solubles en etanol (resinas), índice de oxidación, compuestos fenólicos y contenido total de flavonoides. De otro lado, el propóleo es clasificado como un material subestándar si presenta un elevado contenido de ceras, impurezas mecánicas o metales pesados. Sobre esta base, la presente investigación reporta el control de calidad para dos muestras de propóleos colombiano y a partir de los resultados obtenidos, se proponen posibles aplicaciones en el desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos innovadores. Los resultados evidencian que las muestras investigadas son clasificadas como de baja calidad debido a su elevado contenido de ceras. Sin embargo, esta aparente desventaja puede generar valor agregado cuando el propóleo se emplea, por ejemplo, en la preparación de sistemas nano y microparticulados y nanofibras para películas y soportes tisulares.

Palabras clave: Propolis, productos apícolas, control de calidad, farmacéuticos, cosméticos.

INTRODUCTION

In general terms, raw propolis is composed of 50% of resin and vegetal balsam, that contains the most of biologically active substances; 30% to 35% of waxes; 5% to 10% of aromatic oils; approximately 5% of pollen and at lower proportion, organic waste. Additionally, in propolis there are sodium, calcium, magnesium, zinc, potassium, silicon, iron, sulfur and aluminum [1], and vitamins such as thiamin, riboflavin, pyridoxine, ascorbic acid, and α -tocopherol [2-4].

As one of the bee products with higher biological and pharmacological activity, due to the diversity and a large number of its compounds [5, 6], the medicinal and personal-care uses of propolis have been reported since ancestral times. Approximately, more than three hundred different chemical compounds are identified in this material including flavonoids, phenolic acids, acetophenone derivatives, lignans, terpenes, volatile components (such as monoterpenes and sesquiterpenes), aromatic compounds, sugars, hydrocarbons, and monoesters [5, 7]. Thus, up to now, there is evidence of propolis activity as antimicrobial [8-10], antifungal [11, 12] and antiviral [13, 14].

However, the composition of propolis depends on the geographical location of the beehive because of variations of the exudates and the secretions of the surrounding plants [2, 15]. Likewise, seasonality, illumination, altitude, race of bees, method of propolis harvesting and parallel activity in the zone of the hive location influence the propolis composition [15]. On this basis, propolis could be harnessed in many ways at an industrial level depending on its quality. For this reason, this research work deeps on the quality of two samples of Colombian propolis as a starting point for identifying their potential applications in pharmaceuticals and cosmetics. It is the interest to increase the awareness of propolis as a natural resource and to provide readers with criteria for taking advantage of its composition with a view to developing innovative products from this raw material.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The first raw propolis sample (PrS) used in this study was collected from hives of stinging bees, *Apis mellifera*, in Confines, Santander, Colombia (6°21'21.0"N 73°14'27.0"W, altitude: 1498 masl). The second raw propolis sample (PrJB) was kindly donated by the Joaquín Antonio Uribe Botanical Garden of Medellín, Antioquia, Colombia (6°16'15.0"N 75°33'51.0"W, altitude: 1486 masl), collected from hives of stingless native bees, *Tetragonisca angustula*. Both propolis samples were stored at -20 °C in plastic containers.

Others materials used in this research work include ethyl acetate (EtAc; Tedia), n-hexane (J.T.Baker), methanol (MeOH; J.T.Baker), pharmaceutical grade ethanol 96% (Chemi), chloroform (Aldrich), sulfuric acid (Mallinckrodt), aluminium chloride 6-hydrate (Panreac), quercetin (Sigma-Aldrich, purity \geq 95%, Lot SLBD8415V), sodium nitrite (Merck), 2-aminoethyl diphenylborinate (Sigma-Aldrich), PEG 4000 (Sigma-Aldrich), sodium sulfate anhydrous (Carlo Erba), vanillin (Merck), anisaldehyde (Carlo Erba). For analyzing the samples of Thin Layer Chromatography (TLC), TLC Silica Gel 60 F254 plates (Merck Millipore) were used as stationary phase and as a mechanism of detection Godin's reagent [aspersion of 1% ethanolic vanillin (Merck), 10% ethanolic sulfuric acid (Mallinckrodt)], anisaldehyde-sulfuric acid reactive [0.5 mL of anisaldehyde (Carlos Erba), 10 mL of glacial acetic acid (Mallinckrodt), 85 mL of MeOH (J.T. Baker), 5 mL of 96% sulfuric acid (Mallinckrodt), and natural products - polyethylene glycol reactive (NP-PEG) [mixture of 1% methanolic diphenylboriloxietilamine (NP, Sigma-Aldrich) and 5% ethanolic polyethylene glycol 4000 (PEG 4000, Sigma Aldrich) at a ratio 5:4]. Distilled water was used in all experiments (Boeco distiller WS8000).

Methods

As shown in figure 1, different parameters were included for investigating the quality of propolis. The used methodologies are based on standard methods stated by the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) and the United States Pharmacopoeia (USP), or by procedures reported in different published research works.

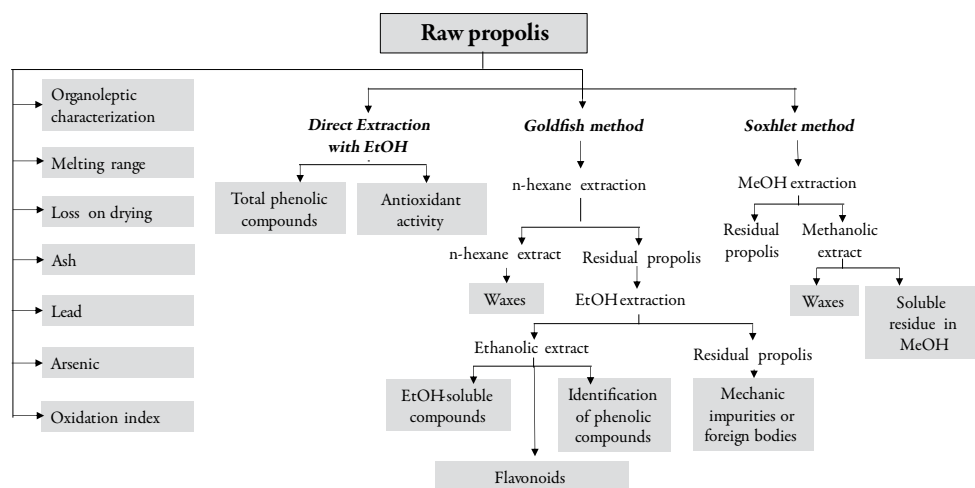


Figure 1. A synthesis of the tests used for characterizing raw propolis. Procedures carried out on raw propolis /procedures requiring propolis extraction.

Organoleptic characterization: Propolis was evaluated in its odor, color, flavor, consistency, and aspect at room temperature.

Melting range: A small quantity of raw propolis was located at the capillary tube of a melting point apparatus (Büchi SMP-20) having silicone as a heating medium. The starting and ending temperature of the melting process were recorded [16] and the results are reported as the mean of five independent measurements with a 95% confidence interval.

Waxes or n-hexane extractable material: Raw propolis (2 g) was extracted by the Goldfish method with 90 mL of n-hexane for 6 h [17]. The content of waxes corresponds to the remaining material in the flat-bottom flask, once the extraction process was finished and all the organic solvent was removed by evaporation (oven Heraeus Instruments). The n-hexane extractable material is reported as a percentage of the raw propolis sample from the mean of two independent measurements with a 95% confidence interval.

Soluble residue in methanol (dry residue): As reported by Funari and Ferro [18], 10 g of propolis were treated for 8 h with approximately 150 mL of methanol by using the Soxhlet method. The extract was transferred in a graduated cylinder taking care of rinse the used flat-bottom flask with methanol. The final volume of the extract was measured, and it was stored in an amber recipient in a refrigerator (2°C) for 24 h and then, in a freezer (-20°C) for 0.5 h. Afterward, it was filtered in a Büchner funnel using Boeco qualitative filter paper No. 3. A 5-mL aliquot of the wax-free methanolic extract was transferred to a crucible (previously dried at 105 °C for 2 h, cooled in a desiccator and weighted). The set was dried in an oven at 105 °C for 2 h, cooled in a desiccator and weighted. The procedure was repeated up to constant weight. The soluble residue in methanol was reported as a percentage of the raw propolis from the mean of six independent measurements, with a 95% confidence interval.

Ethanol-soluble compounds or percentage of ethanolic extract: The determination of resins was carried out as reported by Bedascarrasbure *et al.* [17]. Thus, the remaining raw propolis sample once the test of n-hexane extractable material was finished, was extracted with ethanol using the Goldfish extraction apparatus. For this purpose, about 90 mL of ethanol were added to the 250-mL flat-bottom flask and the boiling of solvent was allowed; these work conditions were maintained for 6 h, with a flow rate of 120 to 150 drops of condensate per min. The extraction process finished when the ethanol was colorless. As additional checking, a drop of ethanol was added to 2 mL of a 10% ferric chloride solution; if the color changed from yellowish to greenish, the presence of phenolic compounds was confirmed, and the extraction must continue.

When the extraction process finished, the ethanolic solution was quantitatively transferred to a 100-mL volumetric flask and the volume was completed with ethanol. Then, an aliquot of 50 mL was distilled in a bath at 80 °C, the residue was dried at the same temperature (oven Heraeus Instruments) and cooled in a desiccator. The drying and cooling processes were repeated up to constant weight. The obtained residual corresponds to the ethanol-soluble compounds that were reported as a percentage of the raw propolis sample. The results are reported as the mean of two independent measurements with a 95% confidence interval. The remaining ethanolic extracts of the two replicates were mixed and stored in a 100-mL amber recipient for additional determinations.

Mechanic impurities or foreign bodies: For determining the mechanic impurities in propolis the procedure reported by Bedascarrasbure *et al.* [17] was followed. To this end, the remaining raw propolis sample once the tests of n-hexane extractable material and ethanol-soluble compounds were finished, was dried in an oven (Heraeus Instruments) at 80 °C for 1 h, cooled in a desiccator and led to constant weight. The mechanic impurities were reported as a percentage of the raw propolis sample from the mean of two independent measurements with a 95% confidence interval.

Loss on drying: Propolis sample was weighted (3.0 g) into a Petri dish that was previously stored in an oven at 135°C for 1 h, cooled in a desiccator and weighted. The set was drying at 135°C ± 2°C for 4 h (oven Heraeus Instruments) and cooled at room temperature in a desiccator. The procedure was repeated until a constant weight was reached [19]. The loss on drying was expressed as the percentage of weight loss of the sample and the results are reported as the mean of three independent measurements with a 95% confidence interval.

Ash: To determine the content of ash in propolis, the AOAC protocol was followed with some modifications [20]. In this way, 3.0 g of propolis were weighted into a porcelain crucible (that was previously dried at 550°C for 1 h, cooled at desiccator and weighted). A slow pre-calcination of the sample was done on a heating plate (IKA® C-MAG HS 7) and then, it was calcinated at 550°C for 12 h (muffle Hotpack) to obtain white ashes. The set was removed, cooled in a desiccator at room temperature and weighted. Ash content is expressed as a percentage and the results are reported as the mean of three independent measurements with a 95% confidence interval.

Lead: The Method II of the USP 38 [21] was used for the detection of lead in a limit assay (2 ppm), utilizing a propolis sample of 10 g.

Arsenic: Digestion of propolis (0.5 g) was carried out by reflux with concentrated HNO₃ (5 mL) until digestate is light in color and it does not change by visual inspection. Then, digestate was diluted to 10 mL. The quantitative analysis by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES; ICP spectrometer Icap 7400, Thermo Scientific; optic system type Echelle polychromator; detector in solid state CID -Charge Injection Device-; software: QTEGRA) was carried out following the “Standard Methods”, 3120 A, B reported by Rice, Baird, Eaton and Clesceri [22]. Argon gas ionized by radiofrequency was used as a source of plasm working at a temperature near to 9000 K. Digested propolis was analyzed to 189.042 nm with a calibration blank and a method blank. The quantification was made using arsenic internal standard. Instrumental detection limit, precision, optimum background correction position, linear dynamic range and correction for interferences were established. The routine procedures for the test quality control were executed (*e.g.* checking the memory effect and verification with the standards of continuous calibration).

Oxidation index: A ground propolis sample (0.2 g) was placed in a 125-mL erlenmeyer and 5 mL of 96% ethanol were added, and after 1 h, 100 mL of distilled water were added. The obtained dispersion was filtered (Boeco qualitative filter paper No. 3). In a test tube 2 mL of filtered were added with 1 mL of 20% sulfuric acid and all was stirred in a vortex for 1 min; then, a drop of 0.1 N KMnO₄ was added and the time of

discoloration was measured [17]. The result is reported as the mean of six independent measurements with a 95% confidence interval.

TLC characterization: Propolis extracts were tracked by TLC using chloroform: EtAc (70:30) as mobile phase and visualized by NP-PEG and Godin's reagent.

Identification of phenolic compounds: In this test, the ethanolic extract obtained in the ethanol-soluble compounds test was also used. Thus, a dilution of that extract was prepared with ethanol (*e.g.*, 1 to 1000) so that absorbances between 0.5 to 0.8 units were read at 290 nm. Then, scanning was done between 240 nm and 420 nm. It was considered that phenolic compounds were present in absorption maxima between 270 nm and 315 nm [17].

Content of phenolic compounds: The total phenolic compounds were determined following the Folin-Ciocalteu method [23-25]. For the sample processing, 0.5 g of ground propolis and 15 mL ethanol were placed inside a 100-mL beaker. The mixture was protected from light, stirred with a magnetic bar at 500 rpm for 30 min, and stored during 24 h at room temperature. The obtained extract was filtered and transferred to a 50-mL volumetric flask; this solution was kept in freezing at -20 °C until its analysis. To measure phenolic compounds, 500 µL of ethanolic propolis extract were added with 500 µL of Folin-Ciocalteu reagent; after 2 min, 2 mL of 10% sodium carbonate solution were also added, and the volume was completed to 50 mL with distilled water. The sample was stored during 2 h protected from light and the spectrophotometric measurement was carried out at 765 nm with distilled water as blank (Genesys[®] 10S UV-Vis Spectrophotometer; calibration line with gallic acid, range: 0.02 - 1.0 mg/mL; r^2 : 0.999). The total content of phenolic compounds is expressed as the mean of the gallic acid equivalent milligrams from nine independent measurements with a 95% confidence interval.

Content of flavonoids: The flavonoids in propolis were determined according to Bedas-carrasbure *et al.* [17] and Woisky and Salatino [26] with some modifications. In brief, 1 mL of ethanolic propolis extract (10 mg/mL) was mixed with 0.5 mL of 5% AlCl₃ methanolic solution and completed to 10 mL with methanol. A blank solution was similarly prepared using 96% ethanol instead of the sample. The solutions were stored in darkness for 30 min and their absorbance was spectrophotometric determined at 425 nm (calibration line with quercetin dihydrate, range: 1.2 - 15.1 microgramos/mL; r^2 : 0.999). The content of flavonoids is expressed as the percentage of quercetin from two independent measurements with a 95% confidence interval.

Antioxidant activity: To this end, the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) test reported by Ahn *et al.* [27] was followed with some modifications. Thus, the

absorbance of the ABTS⁺ radical working solution (1 mL) was read at 734 nm, using ethanol as blank. Immediately, 10 microlitros of the ethanolic propolis extract, obtained in the test for phenolic compounds, were added to the working solution, the system was stirred, and the absorbance of the mixture was measured after 6 min. The difference in absorbances between the initial time (zero minute) and the final time (six minute) was expressed in mM of Trolox/g of propolis by using a calibration line of Trolox, *i.e.*, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (range: 0.2 mM and 2.0 mM, r^2 : 0.993) and from the mean of nine independent measurements with a 95% confidence interval.

RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned, propolis is a raw material of natural source highly valued in pharmaceuticals and cosmetics because of its content of active molecules. However, to make statements about the harnessing of propolis in these fields is not easy considering the different factors determining its quality and purity and the approximately 17500 species of bees reported worldwide [28], of which approximately one thousand collect propolis [29]. Only in Colombia, nearly 466 species of bees have been listed [30] where variations in quality are demonstrated [31].



























Therefore, in this work, an approach based on the typical quality controls of propolis is used to propose its potential applications in the design of pharmaceutical and cosmetic products. Although there is a large number of test to be carried out to this end [32], in this work the physicochemical properties of propolis (organoleptic characterization, melting range and loss on drying), its purity (ash, mechanic impurities, n-hexane extractable material, lead, and arsenic), and the general characterization, identification or quantification of active compounds (ethanol-soluble compounds, oxidation index, TLC characterization, identification and quantification of phenolic compounds, content of flavonoids and antioxidant activity) were chosen.

To interpret the results, the Brazilian legislation [33, 34] and the Argentine legislation [35] were used as reference considering the geographical proximity with Colombia (see table 1). Also, USP specifications were taken into account due to our pharmaceutical and cosmetic approach.

Physicochemical properties of propolis













In general, propolis is described as a malleable to rigid material of homogeneous or heterogeneous aspect, with characteristic flavor (from mild balsamic to strong and

Table 1. Quality control sheet of two samples of Colombian propolis.

| Test | Acceptable range criteria | PrS | | PrJB | |
|--|--|---|----------------|---|---------------|
| Odor | Characteristic: resinous or balsamic |  | Resinous |  | Resinous |
| Color | Yellow, brown, greenish, reddish and others |  | Dark brown |  | Dark brown |
| Flavor | Characteristic: from mild balsamic to strong and spicy |  | Slightly spicy |  | Balsamic |
| Consistency at room temperature | Malleable to rigid |  | Rigid |  | Rigid |
| Aspect | Homogeneous or heterogeneous |  | Heterogeneous |  | Heterogeneous |
| Melting range | Not reported |  | 58 °C-64 °C |  | 58 °C-67 °C |
| Loss on drying | NMT 8% ¹ ; NMT 10% ² |  | 1.8% ± 0.1% |  | 5.2% ± 0.3% |
| Ash | NMT 5% ^{1,2} |  | 0.8% ± 0.1% |  | 1.2% ± 0.3% |
| Mechanic impurities | NMT 40% ¹ ; NMT 25% ² |  | 11.5% ± 0.23% |  | 25.8% ± 0.84% |
| Waxes or n-hexane extractable material | NMT 25% ¹ ; NMT 40% ² |  | 72.5% ± 3.5% |  | 58.6% ± 2.1% |
| Ethanol-soluble compounds | NLT 35% ¹ ; NLT 30% ² |  | 23.2% ± 0.04% |  | 15.7% ± 1.61% |
| Soluble residue in methanol | NLT 35% ¹ ; NLT 30% ² |  | 27.6% ± 2.24% |  | 35.9% ± 0.81% |
| Oxidation index | NMT 22 seconds ^{1,2} |  | < 5 s |  | 120 s ± 7 s |

(Continued)

Table 1. Quality control sheet of two samples of Colombian propolis.

| Test | Acceptable range criteria | PrS | | PrJB | |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| Spectrum of UV-VIS absorption | Characteristic signals of the main types of flavonoids between 200 and 400 nm ¹ , 270 and 315 nm ² |  | Maximum of absorption: 284 nm |  | Maximum of absorption: 281 nm |
| Phenolic compounds | NLT 5 % (expressed as gallic acid) ^{1,2} |  | 3.0% ± 0.3% |  | 2.9% ± 0.3% |
| Antioxidant activity (TEAC) | Expressed as mmol Trolox/g of sample |  | 0.4 ± 0.1 |  | 0.5 ± 0.1 |
| Flavonoids | NLT 0.5% ^{1,2} |  | 0.2% ± 0.002% |  | 0.2% ± 0.002% |
| Lead | NMT 2.0 mg/Kg ^{2,3} |  | < 2.0 mg/Kg |  | < 2.0 mg/Kg |
| Arsenic | NMT 1.0 mg/Kg ² |  | 0.1 mg/Kg |  | 0.2 mg/Kg |

¹[33,34]. ²[35]. ³[21]. *NMT: no more than **NLT: no lower than.

spicy) and characteristic odor (resinous or balsamic). The propolis color may well be varied according to the origin, but yellow, brown, greenish, reddish are the most common ones.

As shown in table 1, the investigated samples of Colombian propolis are similar in appearance; they are of heterogeneous aspect, rigid consistency, with melting range around 60 °C, dark brown color and resinous odor. Differences are detected in flavor, which varies from slightly spiced (PrS) to balsamic (PrJB). On the other hand, both samples comply with the reference standards about the loss on drying, i.e., the content of volatile matter including water.

Purity quality control of propolis

The evaluation of purity for a raw material intended to be used in the preparation of drugs and cosmetics include different tests that are chosen considering its origin. For propolis, the residue of ignition evidences its mineral content, which is a crite-

tion to identify possible adulterations, especially for propolis samples supplied as a dry powder [36]. In addition, foreign bodies are present *per se* in propolis, because they can be introduced by bees during the collection of resinous exudates from plants [37]. At the same time, when the beekeepers collect propolis, additional elements could be incorporated such as soil or vegetal material remains. So, the elaboration and collection of propolis impact its quality and the test for mechanic impurities or foreign bodies provides information to evaluate the importance of such contamination.

As shown in table 1, the two investigated samples of propolis comfortably meet the requirements established by the regulations of reference for ash and mechanic impurities; however, purification processes to remove mechanic impurities must be considered to obtain a raw material useful in pharmaceuticals and cosmetics.

To the purpose of this study, the results obtained from waxes (n-hexane extractable material) are of particular concern. So, in this bee product is desirable a minor proportion of waxes, owing to the absence of active molecules in them [18]. On this basis, the investigated propolis samples must be classified as a beekeeping product of low quality considering the high percentage of these compounds quantified via the n-hexane extractable material. However, from this supposed disadvantage arises the possibility of using propolis as a raw material material for the preparation of novel pharmaceutical and cosmetic lipid systems as it will be discussed later.

On the other hand, the hive products become contaminated with heavy metals as a result of bee's foraging [38], or derivate of practices of apiculture. One of the heavy metals of higher toxicity is lead, which is mostly found in air due to pollution of men's activities. By way of example, concentrations ranging between 0.07 and 3.75 mg of lead/Kg of propolis were reported for Andalusian propolis [1]; and in another research, three over four samples of Argentine propolis do not comply the specification stated by the Argentine Food Code [39]. Moreover, samples of propolis from the south of Poland contains between 0.89 and 2.94 mg of lead/Kg of propolis [40].

In our case, the lead content for the two investigated propolis is lower than the USP limit test [41]. Although these results were obtained by an analytic technique less sophisticated than those reported in other research works [1, 39, 40], the USP methodology may result valid considering the objective of this research.

Regarding arsenic, low quantities were found in the investigated propolis samples (Table 1). This toxic metal in propolis is from environmental pollution coming from rocks, soil, vegetables, and diverse aquifer sources [41], and for example, concentrations between 0.075 mg/Kg and 0.130 mg/Kg are reported for Andalusian propolis [1].

It is important to consider that propolis is suggested as an environmental marker for the geographic location of its beehive [42]; therefore, the results of heavy metals can be interpreted as a positive marker for the Botanical Garden of Medellín (Antioquia) and Confines (Santander), the places of origin of the samples chosen for this work.

Quality control regarding active substances content of propolis

The test of ethanol-soluble compounds evidences the amount of resins that bees collect from several vegetable species for making propolis [43]. Thus, the higher the levels of resins are, the greatest the expected biological activity is. Accordingly, due to the ethanol-soluble compounds are lower than the reference specifications (see table 1), the investigated samples of propolis are limited regarding the content of active substances.

With respect to oxidation index, it is a parameter for predicting the time elapsed since the propolis's harvesting, the type of storage and the antioxidant activity of the sample [44,45]. The obtained results for the worked samples shown that PrS meets the limit established in the regulations of reference; in contrast, PrJB is out-of-specification. Implications of these results can be identified from the stability of this raw material and their impact on the stability of the final pharmaceutical or cosmetic product. Thus, the oxidation index becomes one of the critical parameters to follow the quality of propolis, to define its re-test period and, to choose its packaging, storage, and transport.

Different extraction methods of biologically active compounds have been studied in the propolis [46,47], being the used dissolvent one of the more influencing factors [48,49]. Therefore, in this research work, the extracts of propolis obtained along the quality control test were used for tracking by TLC. This simple chromatographic technique allows the separation of complex mixtures and the visual detection of multiple compounds [50]. Moreover, it has been used as a quick screening for molecules with pharmacologic activity (phenolic acids and flavonoids) in different samples of propolis [51].

As shown in figure 2, there are differences in composition between the two propolis investigated and among the used extraction methods. The without-revealing plate observed at UV 254 nm (see figure 2A) evidences compounds having at least a conjugated double bond in their structure [52], for example, phenylpropane derivatives such as esters of caffeic acid, flavonoids and amino acids [53].

On the other hand, NP-PEG reagent enables the detection of flavonoids, intensifying its fluorescence at UV 365 nm (see figure 2B) and whose color depends on the structure of the compounds. Aglycones are the predominant flavonoids in propolis due to enzymatic hydrolysis that bees do on the glycosidic conjugates during the collection of resins and the incorporation of waxes [54, 55]. Also, it could be a consequence of

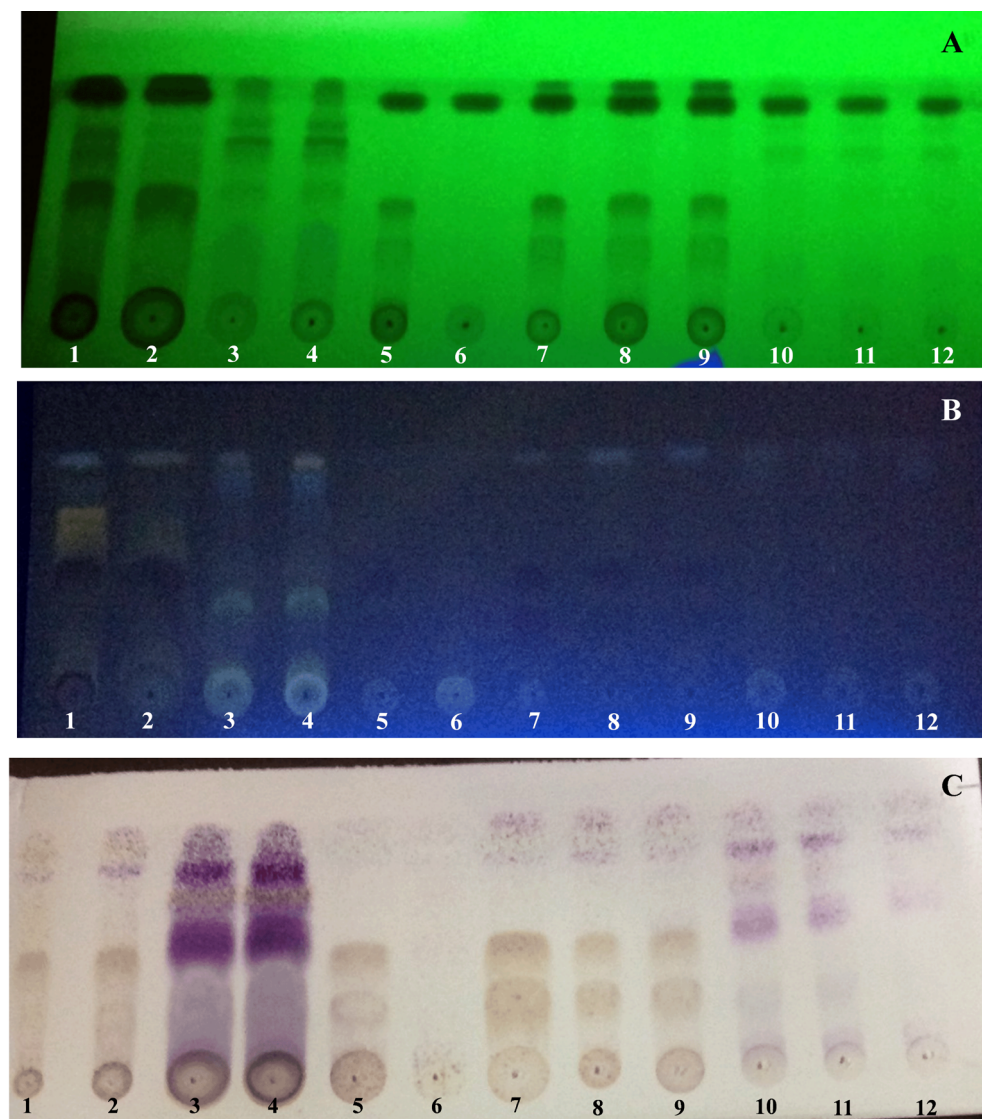


Figure 2. Tracking of propolis extracts by TLC. Mobile phase: Chloroform: EtAc (70:30). (A) Without-revealing chromatogram seen at UV 254 nm. (B) Chromatogram revealed with NP-PEG seen at UV 365 nm. (C) Chromatogram revealed with Godin. Where: 1-4: methanolic extracts for the determination of soluble residue in MeOH; 1-2: replicates from PrS; 3-4: replicates from PrJB; 5-6: ethanol extracts after a previous extraction of waxes with n-hexane; 5: extract from PrS; 6: extract from PrJB; 7-12: ethanol extracts for the determination of total phenols; 7-9: replicates from PrS; 10-12: replicates from PrJB.

the chemical composition of the vegetable exudates, since aglycones are identified in several plants [56]. This is coherent with figure 2B, where the fluorescence at spots of application in TLC is tenuous or absent. Likewise, the use of Godin's reagent (see figure 2C) demonstrates the presence of terpenoids and phenylpropanoids [52]. Such compounds have been previously reported for propolis, including derivates of cinnamic, benzoic and phenylpropanoid acids [57-59] and volatile hydrocarbons C_{10} that gives it the characteristic smell [37].

To complement this work, the UV spectra of the ethanolic extracts after removal the lipid material were run because they are characteristic fingerprints for propolis of specific geographic zones that evidence differences in the composition of polyphenols and flavonoids [23, 60]. As shown in figure 3, flavonoids are detected by the presence of aromatic rings in the spectral band between 240 nm and 280 nm, that is assigned to ring A of this kind of compounds [61]. It is highlighted that a minor dilution to the recommended by Bedascarrasbure *et al.* [17] was required to obtain an adequate analysis (1 to 50 in EtOH for PrJB and 1 to 100 in EtOH for PrS), suggesting a low content of phenolic compounds in the investigated propolis.

To corroborate this latest finding, the content of total phenols was quantified according to the Folin-Ciocalteu method. Indeed, although some Colombian propolis exceed the content of phenolic compounds established for the reference standards [27, 46, 62], PrS and PrJB are out-of-specification discouraging their harnessing as an interesting source of active molecules.

In addition, considering that the types of flavonoids in the propolis are diverse [54, 57, 63] and include flavones [64], flavonols [48], flavanones [65], flavanonols [66], chalcones [67], dihydrochalcones [68], isoflavones [69], isoflavans [70,71] and neoflavonoids [72], two reported colorimetric methods based on the formation of colored

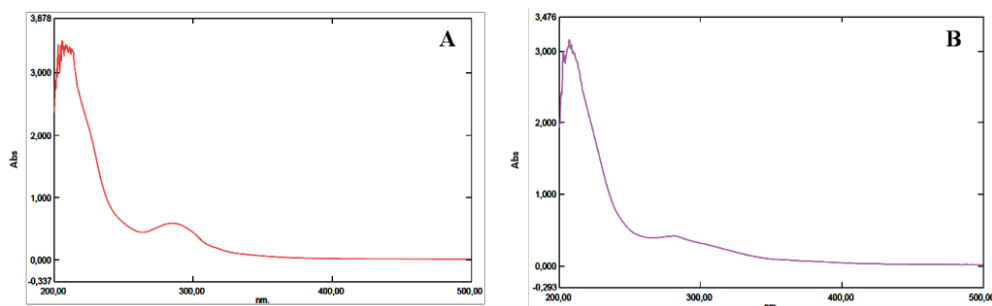


Figure 3. UV spectra of ethanolic extracts of propolis from different geographic origin. A) PrS. B) PrJB.

complexes (in one of them with aluminum chloride and in the other one with sodium nitride), were used to quantify the flavonoids present in the investigated samples of propolis.

It is known that when using aluminum chloride, the complexes are characterized for different absorption maxima and in some cases, the quantification around 425 nm underestimates compounds such as flavanones and their glycosides; then, the method is only useful for quantifying flavones and flavonols. Regarding the procedure using sodium nitride, it is less selective due to the formation of complexes with non-flavonoid compounds that have in their structure catecholic units as the chlorogenic acid [73].

In fact, the results for the investigated samples of propolis evidenced that flavonoids quantified by the method using sodium nitride are ten times higher than those obtained when aluminum chloride is used. For this reason, only the results based on aluminum chloride were reported in table 1 choosing the conservative estimate. Our results are lower than those previously reported by researchers in Colombia [74, 75]; but they are in line with the reported works also carried out in Colombia, where propolis does not comply with the international standards [76].

This could be attributed to the botanical sources near the hive that do not have the strong solar stimulus required to improve the synthesis of these secondary metabolites [77, 78]. Also, it must be in mind that the synthesis of flavonoids in some vegetable species depends on the several factors as the hour of day, the photoperiod and the length of the day [79], the season of the year [80, 81], the environmental stimuli and the stress abiotic factors as droughts, floods, changes of temperature and, contamination, among others [82]. In addition, the diminution in the investigated samples of the amount of phenolic molecules as flavonoids might result because of the role of propolis as a natural protection for the hive against pathogens and other agents [43].

Finally, the antioxidant activity of propolis was investigated by the TEAC method that quantifies both lipophilic and hydrophilic antioxidants [83]. The results indicate a lower content of antioxidants than other samples of propolis [76]. However, care must be taken to interpret these results because TEAC is not a specific method due to any hydroxylated molecule, without distinguishing its antioxidant ability, could also be quantified [84].

According to the last results, the investigated propolis samples do not offer advantages as a potential source of active molecules. However, low concentrations of actives, particularly antioxidant agents, may be present considering the high content of lipid compounds that might exhibit a synergist role with other compounds of the pharmaceutical and cosmetic formulations.

POTENTIALITIES OF THE INVESTIGATED PROPOLIS FOR THE DEVELOPMENT OF PHARMACEUTICAL AND COSMETIC PRODUCTS

In general terms, from the quality control standpoint, the investigated samples of Colombian propolis have a no homogeneous aspect, characteristic flavor, low content of molecules with biological activity, a high percentage of waxes and, low presence of contaminants. Consequently, different alternatives can be proposed for promoting their harnessing in the cosmetic and pharmaceutical fields. Among them, the use of propolis as starting material for developing lipid systems is highlighted.

In this way, propolis could be used for making conventional body care products containing lipids, like creams, ointments, lotions and, oily preparations, among others; e.g., propolis lipsticks have been reported [85]. However, considering their composition, the investigated propolis could be used to make innovative developments. Thus, waxes might be a key ingredient of formulations as micro and nanoparticulate lipid systems, that are continuously investigated because of their advantages associated to their entrapment efficiency for hydrophobic drugs, easy scale-up, biodegradable composition, relative nontoxic nature and stability [85-89].

Likewise, propolis can be used to prepare nanofibrous composite scaffolds [90, 91] or natural rubber latex membranes [92] for bone tissue engineering thanks to the malleable behavior that enhances the tensile strength of the polymer used as support. A green approach in the same direction has been reported by Sharaf, Higazy and Hebeish [93], who investigated the propolis applicability to obtain cotton textiles having antibacterial activity.

We know that the investigated propolis have a low content of active molecules. Nevertheless, they might be added to cosmetic formulations to contribute as a natural raw material in products with claims as antibacterial, e.g., in biocomposite films for the care of the oral cavity [94, 95], or as a moisturizer, revitalizing, and restoring of the skin's elasticity [96, 97]. In line with this, propolis can also be encapsulated in nano or microparticulate systems [88, 98] for preventing contact dermatitis or showing specific biological activity [99, 100]. By way of example, propolis loaded silver-silica systems exhibiting enhanced antifungal and antibacterial properties, have been reported. These carriers, obtained from silver nanoparticles and propolis, both located into the channels or on the surface of nanoporous supports, could be used for wound healing [87]. Also, oral pathogens can be treated by using propolis microparticles [101, 102].

It is important to bear in mind that purified propolis must be used to formulate these kinds of products attending to the concerns about safety when its use in humans is intended [15, 103]. In fact, the presence of pesticides and antibiotics, as well as the microbial quality of propolis must be taken into account. These tests were not carried out in this work for the investigated samples; so, if necessary, purification processes must be considered before their use to develop medicines and cosmetic products.

In addition, as a heterogeneous material with compounds covering all the possibilities of solubility, the formulation of homogeneous pharmaceutical forms could result in a challenge. Moreover, as it has been highlighted by Bankova [104], this chemical variability makes it difficult to get standardized propolis and the biological activity of the products, rather than their quality control, could be used as an indicative criterion for guaranteeing reproducibility in quality of the final products. Also, product designers must be aware that the industrial processing of propolis, particularly the steps involving melting of this material, could cause instabilities of the active molecules that put in risk the stability of the drug and cosmetic products containing it.

In summary, although the quality of propolis depends on several factors and it is possible to have sub-standard material due to the content of active substances, as in the case of the investigated samples, its potential use in pharmaceuticals and cosmetics results attractive. Propolis could be formulated in innovative delivery systems where the mechanical properties or the presence of non-active components results advantageous. In addition, this leads to natural products according to the market trends and the consumer's requirements.

CONCLUSIONS

A comparative view of two samples of Colombian propolis was obtained from the quality control analysis carried out according to the standard methods stated by the AOAC, the USP, and procedures previously reported. The results, mainly those evidencing the low content of molecules with biological activity, reveal that these propolis are sub-standard beekeeping products. Thus, their use as a source of active molecules of interest for developing medicines and cosmetics is very limited.

Nevertheless, the high waxy content of the investigated propolis, another criterion that classifies them as sub-standard materials, open exciting potentialities for their harnessing. In this sense, taking as starting point experimental evidence of other research teams, different alternatives were proposed for promoting its application in the pharmaceutical and cosmetic industries. Among them, the use of propolis waxes as starting material for developing lipid systems is highlighted.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by National Program of Seedbeds of Research, Creation and Innovation of Universidad Nacional de Colombia 2013-2015, project 28405; Program of Stimuli to Research Thomas van der Hammen, and Jardín Botánico José Celestino Mutis.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. J. Serra Bonvehí, F.J. Orantes Bermejo, Element content of propolis collected from different areas of South Spain, *Environ. Monit. Assess.*, **185**, 6035 (2013).
2. M.C. Marcucci, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, **26**, 83 (1995).
3. T.F. Moreira, Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **1**, 12 (1986).
4. P.G. Pietta, C. Gardana, A.M. Pietta, Analytical methods for quality control of propolis, *Fitoterapia*, **73** Suppl 1, S7 (2002).
5. V.S. Bankova, S.L. de Castro, M.C. Marcucci, Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **31**, 3 (2000).
6. M. Lotfy, Biological activity of bee propolis in health and disease, *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **7**, 22 (2006).
7. A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada, G. Swierczek-Zieba, Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis, *Molecules*, **19**, 78 (2014).
8. M.J. Yaghoubi, G. Ghorbani, S. Soleimani Zad, R. Satari, Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition, *DARU*, **15**, 45 (2007).
9. G. Vardar-Ünlü, S. Silici, M. Ünlü, Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 1011 (2008).

10. K. Ramanauskienė, A.M. Inkėniene, A. Savickas, R. Masteikova, V. Brusokas, Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **66**, 681 (2009).
11. A.N. Koc, S. Silici, F. Mutlu-Sariguzev, O. Sagdic, Antifungal activity of propolis in four different fruit juices, *Food Technol. Biotechnol.*, **45**, 57 (2007).
12. D. Finger, C. Schinieder Machado, Y. Reyes Torres, S. Percio Quináia, A.C. Godot Thomaz, A. Rita Gobbo, M. Chagas Monteiro, A.G. Ferreira, A.C.H. Frankland Sawaya, M. Nogueira Eberlin, Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis, *J. Food Qual.*, **36**, 291 (2013).
13. A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *J. Ethnopharmacol.*, **64**, 235 (1999).
14. A.G. Hegazi, F.K. Abd El Hady, K.H. Haker, N. Modear, S. Houcine, Inhibitory effect of algerian propolis on viral, microbial infection and LDL peroxidation with correlation to its chemical composition, *Mellifera*, **11**, 2 (2012).
15. A.C. de Groot, Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects, *Dermatitis*, **24**, 263 (2013).
16. L.L. Chaillou, H.A. Herrera, J.F. Maidana, Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina, *Ciência e Tecnol. Aliment. Campinas*, **24**, 11 (2004).
17. E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, W. Fierro Morales, A. Álvarez, *Propóleos: caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actual de composición y propiedades*, Ediciones Magna, Tucumán, 2006, pp. 137-170.
18. C.S. Funari, V.O. Ferro, Análise de própolis, *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, **26**, 171 (2006).
19. AOAC, AOAC Official Method 930.15. Loos on drying (moisture) for feeds, in: G.W. Latimer (Ed.), *Off. Methods AOAC Int.*, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, 2012.
20. AOAC, AOAC Official Method 923.03. Ash of flour, in: G.W. Latimer (Ed.), *Off. Methods AOAC Int.*, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, 2012.
21. United States Pharmacopoeia, National Formulary USP 38-NF 33, Heavy metals, in: *U.S. Pharmacopoeia* (Ed.), Rockville, MD, 2015: pp. 241-243.

22. E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri (editores), *Standard Methods Examination of water and wastewater*, 22nd ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012, pp. 40-46.
23. S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chem.*, **84**, 329 (2004).
24. V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, **3**, 144 (1965).
25. K. Slinkard, V. Singleton, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 49 (1977).
26. R.G. Woisky, A. Salatino, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *J. Apic. Res.*, **37**, 99 (1998).
27. M. Ahn, S. Kumazawa, Y. Usui, J. Nakamura, M. Matsuka, F. Zhu, T. Nakayama, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China, *Food Chem.*, **101**, 1383 (2007).
28. C.D. Michener, Bee Taxa and Categories. In: *The bees of the world*, Ed. by C.D. Michener, 2nd ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2007, pp. 66-67.
29. A. dos S. Pereira, B. Bicalho, F.R. de Aquino Neto, Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*, *Apidologie*, **34**, 291 (2003).
30. A.H. Smith-Pardo, A preliminary account of the bees of Colombia (Hymenoptera: apoidea): Present knowledge and future directions, *J. Kansas Entomol. Soc.*, **76**, 335 (2003).
31. M. Silva Rojas, A. Torres, W. Hoffmann, Determinación de propiedades físico-químicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia, *Rev. La Fac. Ciencias Básicas*, **14**, 3 (2016).
32. V. Bankova, D. Bertelli, R. Borba, B.J. Conti, I.B. da Silva Cunha, C. Danert, M.N. Eberlin, S. I Falcão, M.I. Isla, M.I.N. Moreno, G. Papotti, M. Popova, K.B. Santiago, A. Salas, A.C.H.F. Sawaya, N.V. Schwab, J.M. Sforcin, M. Simone-Finstrom, M. Spivak, B. Trusheva, M. Vilas-Boas, M. Wilson, C. Zampini, Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, *J. Apic. Res.*, **58**, 1 (2016).

33. CATEF, Nota técnica sobre o registro de produtos contendo própolis, Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF), Brasil, 2005.
34. MAPA, Instrução Normativa No 3, de 19 de Janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), Brasil, 2001.
35. SPReI, SAGPyA, Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008, SENASA, Argentina, 2008.
36. R.G. Woisky, *Métodos de controle químico de amostras de propolis*, Tesis de maestría en Fármacos y Medicamentos, Universidad de São Paulo, 1996, p. 52.
37. Ö. Gençay Çelemlı, Chemical properties of propolis collected by stingless bees. In: *Pot-Honey*, Ed. by P. Vit, S.R.M. Pedro, D. Roubik, Springer New York, New York, 2013, pp. 525-537.
38. G. Nates-Parra, Á. Rodríguez C., Forrajeo en colonias de *Melipona eburnea* (Hymenoptera: Apidae) en el piedemonte llanero (Meta, Colombia), *Rev. Colomb. Entomol.*, **37**, 121 (2011).
39. G.D. Pierini, A.M. Granero, M.S. Di Nezio, M.E. Centurión, M.A. Zon, H. Fernández, Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes, *Microchem. J.*, **106**, 102 (2013).
40. G. Formicki, A. Greń, R. Stawarz, B. Zyśk, A. Gał, Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring, *Pol. J. Environ. Stud.*, **22**, 99 (2013).
41. R. Singh, S. Singh, P. Parihar, V.P. Singh, S.M. Prasad, Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **112**, 247 (2015).
42. R.O. Orsi, S.R.C. Funari, R. Barbattini, C. Giovani, F. Frilli, J.M. Sforcin, V. Bankova, Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **76**, 637 (2006).
43. M. Simone-Finstrom, M. Spivak, Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, *Apidologie*, **41**, 295 (2010).

44. E.M.A. Bastos, C. Galbiati, E. Loureiro, D. Scoaris, Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*, *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.*, **63**, 1255 (2011).
45. A.A. Machado de Melo, A. Hitomi Matsuda, L. Bicudo de Almeida-Muradian, Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **71**, 540 (2012).
46. I.B.S. Cunha, A.C.H.F. Sawaya, F.M. Caetano, M.T. Shimizu, M.C. Marcucci, F.T. Drezza, G.S. Povia, P.D.O. Carvalho, Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts, *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**, 964 (2004).
47. B. Trusheva, D. Trunkova, V. Bankova, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chem. Cent. J.*, **1**, 1 (2007).
48. M.G. Miguel, S. Nunes, S.A. Dandlen, A.M. Cavaco, M.D. Antunes, Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal, *Food Sci. Technol.*, **34**, 16 (2014).
49. N. Pujirahayu, H. Ritonga, Z. Uslinawaty, Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6**, 338 (2014).
50. C.F. Poole, Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities, *J. Chromatogr. A.*, **1000**, 963 (2003).
51. I. Jasprica, A. Smolčić-Bubalo, A. Mornar, M. Medić-Šarić, Investigation of the flavonoids in Croatian propolis by thin-layer chromatography, *JPC J. Planar Chromatogr. Mod. TLC.*, **17**, 95 (2004).
52. H. Wagner, S. Bladt, Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas, 2nd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, 2001.
53. R. Volpert, E.F. Elstner, Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives, *Zeitschrift für Naturforsch. C.*, **48**, 851 (1993).
54. W. Greenaway, T. Scaysbrook, F.R. Whatley, The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Proc. R. Soc. London*, **232**, 249 (1987).

55. C.P. Zhang, G. Liu, F.L. Hu, Hydrolysis of flavonoid glycosides by propolis β -glycosidase, *Nat. Prod. Res.*, **26**, 270 (2012).
56. E. Wollenweber, H.V. Dietz, Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants, *Phytochemistry*, **20**, 869 (1981).
57. S. Huang, C. Zhang, K. Wang, G.Q. Li, F. Hu, Recent advances in the chemical composition of propolis, *Molecules*, **19**, 19610 (2014).
58. É.W. Teixeira, D. Message, G. Negri, A. Salatino, P.C. Stringheta, Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, **7**, 307 (2010).
59. I.-K. Lee, M.-S. Han, D.-W. Kim, B.-S. Yun, Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 3503 (2014).
60. E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, A. Alvarez, E. Rodríguez, Contenido de fenoles y flavonoides del propóleos argentino, *Acta Farm. Bonaer.*, **23**, 369 (2004).
61. T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, The Ultraviolet Spectra of flavones and flavonols. In: *The systematic identification of flavonoids*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, pp. 41-45; 51-60.
62. L.R. Palomino, *Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia*, Tesis de maestría en Ciencias Química, Universidad Nacional de Colombia, 2009, pp. 75-76.
63. S. Silici, Turkish propolis: chemical constituents, *Mellifera*, **10**, 24 (2010).
64. N. Volpi, G. Bergonzini, Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**, 354 (2006).
65. V. Bankova, S. Popov, N. Marekov, A study on flavonoids of propolis, *J. Nat. Prod.*, **46**, 471 (1983).
66. C. Gardana, M. Scaglianti, P. Pietta, P. Simonetti, Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **45**, 390 (2007).
67. E. Solórzano, N. Vera, S. Cuello, R. Ordoñez, C. Zampini, L. Maldonado, E. Bedascarrasbure, M.I. Isla, Chalcones in bioactive Argentine propolis collected in arid environments, *Nat. Prod. Commun.*, **7**, 879 (2012).

68. R. Christov, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, M. Bertrand, Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin., *Nat. Prod. Res.*, **20**, 531 (2006).
69. A.L. Piccinelli, M.C. Fernandez, O. Cuesta-Rubio, I.M. Hernández, F. De Simone, L. Rastrelli, Isoflavonoids isolated from Cuban propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9010 (2005).
70. B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M.C. Marcucci, P.L. Miorin, F. da Rocha Pasin, I. Tsvetkova, Bioactive constituents of Brazilian red propolis, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **3**, 249 (2006).
71. A.L. Piccinelli, C. Lotti, L. Campone, O. Cuesta-Rubio, M. Campo Fernandez, L. Rastrelli, Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 6484 (2011).
72. S. Awale, S.P. Shrestha, Y. Tezuka, J.Y. Ueda, K. Matsushige, S. Kadota, Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity, *J. Nat. Prod.*, **68**, 858 (2005).
73. A. Pekal, K. Pyrzynska, Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, *Food Anal. Methods*, **7**, 1776 (2014).
74. L.R. Palomino, C.M. García, J.H. Gil, B.A. Rojano, D.L. Durango, Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia), *Vitae*, **16**, 388 (2009).
75. G. Salamanca Grosso, I.L. Correa Carvajal, J. Principal, Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos, *Zootec. Trop.*, **25**, 95 (2007).
76. Y. Rodríguez, F. Sánchez-Catalán, B. Rojano, D. Durango, J. Gil, J. Marín-Loaiza, Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia, *Rev. U.D.C.A. Actual. Divulg. Científica*, **15**, 303 (2012).
77. E. Corradini, P. Foglia, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants, *Nat. Prod. Res.*, **25**, 469 (2011).

78. B.W. Shirley, Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway, *Trends Plant Sci.*, **1**, 377 (1996).
79. L. Jaakola, A. Hohtola, Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants, *Plant, Cell Environ.*, **33**, 1239 (2010).
80. E. Skrzypczak-Pietraszek, J. Pietraszek, Seasonal changes of flavonoid content in *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae), *Chem. Biodivers.*, **11**, 562 (2014).
81. Q. Zhang, Y. Su, J. Zhang, Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* oliver leaf, *Molecules*, **18**, 1857 (2013).
82. P. Rodziewicz, B. Swarczewicz, K. Chmielewska, A. Wojakowska, M. Stobiecki, Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes, *Acta Physiol. Plant.*, **36**, 1 (2014).
83. V. Baltrušaitytė, P.R. Venskutonis, V. Čeksterytė, Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts, *Food Chem.*, **101**, 502 (2007).
84. V. Roginsky, E.A. Lissi, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem.*, **92**, 235 (2005).
85. U. Goik, A. Ptaszek, T. Goik, The influence of propolis on rheological properties of lipstick, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **37**, 417 (2015).
86. A. Gordillo-Galeano, C.E. Mora-Huertas, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **133**, 285 (2018).
87. M. Popova, H. Lazarova, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, J. Mihály, H. Najdenski, I. Tsvetkova, Á. Szegedi, Nanostructured silver silica materials as potential propolis carriers, *Microporous Mesoporous Mater.*, **263**, 28 (2018).
88. J.K. Santana Andrade, M. Denadai, G.R. Santana Andrade, C. da Cunha Nascimento, P. Ferreira Barbosa, M.S. Jesus, N. Narain, Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis, *Food Res. Int.*, **109**, 278 (2018).
89. Y. Soleimani, S.A. Hossein Goli, J. Varshosaz, F. Maestrelli, Propolis wax nanostructured lipid carrier for delivery of β sitosterol: Effect of formulation variables on physicochemical properties, *Food Chem.*, **260**, 97 (2018).

90. C.Y. Chao, M.P. Mani, S.K. Jaganathan, Engineering electrospun multicomponent polyurethane scaffolding platform comprising grapeseed oil and honey/propolis for bone tissue regeneration, *PLoS One*, **13**, 1 (2018).
91. S.K. Jaganathan, M.P. Mani, A.F. Ismail, P. Prabhakaran, G. Nageswaran, Tailor-made multicomponent electrospun polyurethane nanofibrous composite scaffold comprising olive oil, honey, and propolis for bone tissue engineering, *Polym. Compos.*, **40**, 2039 (2019).
92. D.C. Zancanela, C.S. Funari, R.D. Herculano, V.M. Mello, C.M. Rodrigues, F.A. Borges, N.R. de Barros, C.M. Marcos, A.M.F. Almeida, A.C. Guastaldi, Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours, *Mater. Sci. Eng. C*, **97**, 576 (2019).
93. S. Sharaf, A. Higazy, A. Hebeish, Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles, *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**, 408 (2013).
94. A. Abdulkhali, J. Hosseinzadeh, A. Ashori, H. Esmaeeli, Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/poly(lactic acid) composites coated with ethanolic extract of propolis, *Polym. Compos.*, **38**, 13 (2017).
95. J. Roh, K.-R. Kim, Antimicrobial activity of Korean Propolis extracts on oral pathogenic microorganisms, *J. Dent. Hyg. Sci.*, **18**, 18 (2018).
96. P. Jong-Sung, W. Kun-Suk, The Usage and Composition of Propolis Added Cosmetics in Korea. In: *Bee Products*, Ed. by A. Mizrahi, Y. Lensky, Springer, Boston, MA, 1997, pp. 121-124.
97. V. Kostyuk, A. Potapovich, A.R. Albuhaydar, W. Mayer, C. De Luca, L. Korkina, Natural substances for prevention of skin photoaging: Screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics, *Rejuvenation Res.*, **21**, 91 (2018).
98. C. Jansen-Alves, K.F. Fernandes, M.M. Crizel-Cardozo, F.D. Krumreich, C.D. Borges, R.C. Zambiasi, Microencapsulation of Propolis in protein matrix using spray drying for application in food systems, *Food Bioprocess Technol.*, **11**, 1422 (2018).

99. O. Catchpole, K. Mitchell, S. Bloor, P. Davis, A. Suddes, Anti-gastrointestinal cancer activity of cyclodextrin-encapsulated propolis, *J. Funct. Foods*, **41**, 1 (2018).
100. C. Jansen-Alves, D.S.V. Maia, F.D. Krumreich, M.M. Crizel-Cardoso, J.B. Fioravante, W.P. da Silva, C.D. Borges, R.C. Zambiasi, Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities, *Food Hydrocoll.*, **87**, 703 (2019).
101. M.L. Bruschi, E.H.G. Lara, C.H.G. Martins, A.H.C. Vinholis, L.A. Casemiro, H. Panzeri, M.P.D. Gremião, Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **32**, 229 (2006).
102. M.L. Bruschi, M.L.C. Cardoso, M.B. Lucchesi, M.P.D. Gremião, Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization, *Int. J. Pharm.*, **264**, 45 (2003).
103. B.M. Hausen, E. Wollenweber, H. Senff, B. Post, Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review, *Contact Dermatitis*, **17**, 163 (1987).
104. V. Bankova, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 114 (2005).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Y.X. Correa-González, M.A. Rojas-Cardozo, C.E. Mora-Huertas, Potentialities of the Colombian propolis in pharmaceuticals and cosmetics: A standpoint from the quality control, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 762-788 (2019).

Determinación y comparación cualitativa de cannabinoides presentes en productos naturales comerciales del departamento del Cauca, Colombia

Johnnatan Mauricio Giraldo^{1*}, Ricardo Benítez Benítez^{1**}, Rodrigo Andrés Sarria-Villa², Paola Andrea Arango^{1***}, Jaime Martin Franco^{1****}

¹Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales (QPN), Departamento de Química, Universidad del Cauca Carrera 2# 3N-45, Popayán-Cauca.

*E-mails: *jmgiraldo@unicauca.edu.co

**rbenitez@unicauca.edu.co

***parango@unicauca.edu.co

****qcaorganicauc@gmail.com

²Grupo de Investigación Química Analítica Ambiental (GIQA), Departamento de Química, Universidad del Cauca Carrera 2# 3N-45, Popayán-Cauca.

E-mail: rodrigosv@unicauca.edu.co

Recibido para evaluación: 2 de agosto de 2019

Aceptado para publicación: 7 de octubre de 2019

RESUMEN

Actualmente, hay un creciente interés por el estudio de *Cannabis sativa* y sus componentes ya que se le atribuye propiedades terapéuticas en el tratamiento de enfermedades. En Colombia y específicamente en el departamento del Cauca se comercializan productos de cannabis tanto para fines no medicinales como terapéuticos. En consecuencia, es necesario el análisis de estos productos de manera que se pueda conocer la composición de los mismos y el posible efecto que pueda tener sobre la salud.

El análisis de los componentes de estos productos se llevó a cabo empleando la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y espectrometría de masas (EM), de tal manera que permitieron la identificación de las principales especies cannabinoides; Δ^9 -tetra hidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG). La separación de los analitos se llevó a cabo mediante la implementación de una columna analítica C18 de fase reversa, elución isocrática 1 mL/min, presión del sistema 800 PSI, una mezcla de acetonitrilo ACN y buffer fosfato (KHPO_4) en relación 65/35 como fase móvil, volumen de inyección de 10 μL , un tiempo de análisis de 15 min, y detección a 220 nm.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), espectrometría de masas (EM), delta 9 tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabidiol (CBD).

SUMMARY

Determination and qualitative comparison of cannabinoids present in commercial natural products of the Cauca Department-Colombia

Cannabis sativa has now experienced an increasing interest in the study of its components since it is attributed therapeutic properties in the treatment of diseases. In Colombia and specifically in the Cauca Department, Cannabis products are marketed both for non-medicinal and therapeutic purposes. Consequently, it is necessary to analyze these products in such a way that the composition of the products and their possible effect on health can be known. The analysis of the components of these products was carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS), in such a way that they allowed the identification of the main cannabinoid species; Δ^9 -tetra hydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG). The separation of the analytes was carried out by means of the implementation of a reverse phase C18 analytical column, isocratic elution 1 mL/min, system pressure 800 PSI, a mixture of acetonitrile ACN and phosphate buffer (KHPO_4) in relation 65/35 as mobile phase, injection volume of 10 μL , analysis time of 15 min, and detection at 220 nm.

Key words: High performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS), delta 9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabidiol (CBD).

INTRODUCCIÓN

La planta del género *Cannabis* es utilizada mayoritariamente como droga de consumo por su efecto psicotrópico. Sin embargo, el estudio de los componentes de esta planta ha revelado que también tiene efecto terapéutico; lo cual ha llamado la atención de la comunidad científica a nivel nacional e internacional. De acuerdo con los reportes de diferentes autores se han encontrado alrededor de 500 compuestos orgánicos pertenecientes a la especie *Cannabis sativa*.

Los compuestos de mayor importancia son los cannabinoides terpenofenólicos, los cuales hacen parte de la secreción resinosa producida por los tricomas de la inflorescencia femenina de la planta [1]. De los metabolitos anteriores han sido aislados alrededor de 70 compuestos [2-4], siendo el Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) el que presenta mayor efecto alucinógeno, pero también se le ha asociado acción terapéutica sobre algunas enfermedades.

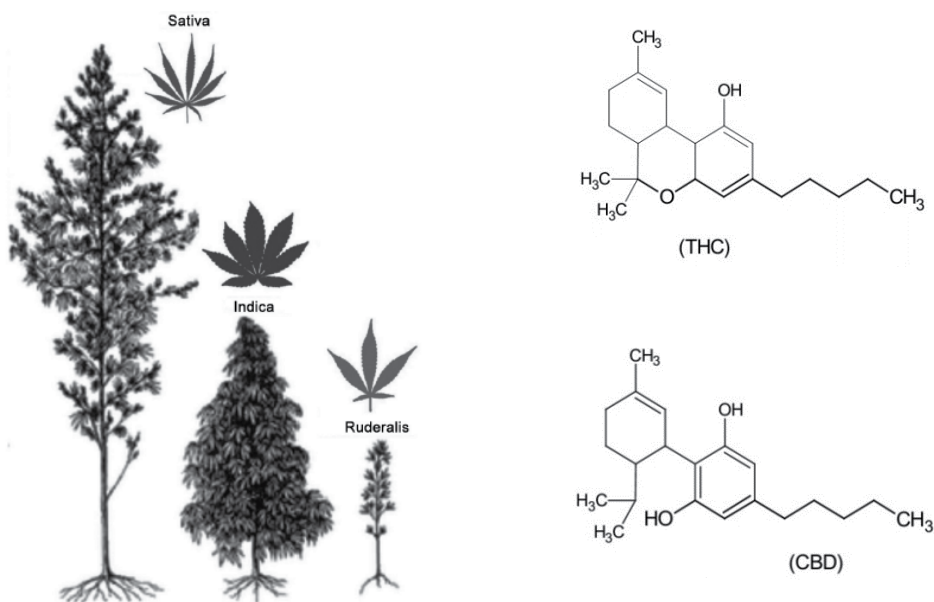


Figura 1. *Cannabis sativa* y estructuras químicas de THC y CBD [5].

La comercialización de productos farmacéuticos a base de marihuana ha experimentado un aumento significativo en los últimos años debido a las propiedades terapéuticas que presentan estas biomoléculas para tratar diferentes enfermedades y síntomas tales como el dolor, epilepsia, trastornos alimentarios y glaucoma; debido a esto la industria farmacéutica mundial ha realizado numerosos estudios para el desarrollo de fármacos a base de cannabis [6-13]. Canadá, Holanda y otros países europeos aprobaron la distribución de medicamentos (Sativex, Dronabinol) en el tratamiento de enfermedades crónicas como esclerosis múltiple y cáncer [6, 14].

En Colombia mediante Decreto número 613 emitido por la Presidencia de la República y el Ministerio de Salud y Protección Social (10 de abril de 2017) estipula el cultivo, uso, comercialización exportación e importación de productos de cannabis con fines médicos y científicos. En el departamento del Cauca es muy conocido el cultivo de la especie de *Cannabis sativa* específicamente en los municipios de Corinto, Caloto, Toribio y Jambaló. Esta especie ha mostrado mayor propiedad terapéutica, debido a esto asociaciones indígenas y también vendedores locales comercializan diversos preparados y extractos a base de cannabis. Sin embargo, estos son distribuidos en diferentes presentaciones las cuales no cumplen con los requisitos estipulados por la legislación colombiana para la producción y fabricación de productos de cannabis de acuerdo con la Resolución 1816 de 2016, la cual en el artículo 28 establece que estos deben contar con análisis de THC, CBN y CBD [15, 16].

Por lo anterior se ve reducida la fiabilidad sobre el consumo de estos medicamentos al no ser claro su contenido y el posible efecto que puedan tener sobre las patologías para las cuales son formulados. Es por ello que se propone la determinación de dichos componentes mediante técnicas como cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y espectrometría de masas (EM) para identificar mediante estudios previos los diferentes compuestos cannabinoides presentes, lo cual permitirá establecer criterios confiables sobre el uso de estos productos. Los resultados obtenidos buscan potencializar la investigación sobre las propiedades de *Cannabis sativa* que se produce en el departamento del Cauca.

METODOLOGÍA

Toma de muestras de *Cannabis sativa*

Las muestras de Cannabis fueron suministradas por asociaciones indígenas del departamento del Cauca [Sannabis, “muestra E (líquida)”] y por el resguardo (huellas). Los cultivos para el procesamiento de estos productos se encuentran ubicados en el municipio de Corinto, Cauca, localización geográfica: latitud: 3.183, longitud: -76.267 3° 10' 59" Norte, 76° 16' 1" Oeste. La muestra D (crema) fue adquirida en las inmediaciones del Puente del Humilladero (Popayán, Cauca, Colombia) la cual fue suministrada por un vendedor local.

Pruebas de solubilidad

Se evaluó la solubilidad de las muestras y su comportamiento en diferentes disolventes (ACN: acetonitrilo, EtOH: etanol, agua, AcOEt: acetato de etilo y MeOH: metanol). Se adicionó 0,05 mg de muestra a cada uno de los solventes.

Preparación de muestras para análisis

Debido al estado físico de la muestra E, la cual presenta una textura viscosa se pesaron 359,9 mg y se solubilizan en 50 mL de ACN, de esta muestra se tomó un volumen de 5 mL y se aforó a 10 mL. Por último, de la anterior solución se tomó una alícuota de 280 μ L y se llevaron a un volumen de 10 mL para obtener una concentración final de 100 ppm. La muestra D se preparó a partir de 297,1 mg en 50 mL de ACN, de esta solución 5 mL fueron aforados con ACN a un volumen de 10 mL y como en el caso anterior de esta muestra se tomó una alícuota de 340 μ L y se llevó a un volumen final de 10 mL para una solución de cannabis con una concentración de 100 ppm. Cada una de las muestras para el análisis se pasó por un filtro de membrana de 0,22 μ m.

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Para el análisis cromatográfico se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR Waters 1325), el cual consta de una bomba binaria y sistema de detección UV-VIS Waters 1320, la adquisición de datos se realizó mediante el *software* Breeze 2.0. Columna analítica Waters C₁₈ fase reversa, tipo de partícula esférica, Micro Bondapak 3,9 x 150 mm, tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 100 Å, la fase móvil es una mezcla acetonitrilo-buffer fosfato 65/35, y el volumen de inyección 10 µL [14]. Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas para la separación de los componentes de las muestras de cannabis, se realizó la separación por fracciones con el fin de realizar la identificación de sus componentes por espectrometría de masas (MS).

Liofilización de las fracciones obtenidas por CLAR

Las fracciones separadas por CLAR fueron concentradas en un liofilizador Labconco, temperatura de colector -50 °C, capacidad de retención de hielo 2,5 L, desplazamiento de la bomba de vacío 86 L/min. Se tomaron alícuotas de 1,5 mL de cada fracción y se colocaron en recipientes para centrifuga de 2 mL. En este proceso las muestras se dejaron durante dos días hasta obtener un sólido blanco, las condiciones empleadas para el análisis fueron: presión 0,470 mbar y temperatura de -51 °C. Las muestras liofilizadas fueron disueltas en acetonitrilo y analizadas en el espectrómetro de masas. Para el análisis cromatográfico se adoptó la metodología reportada por Gámbaro *et al.* [14], los parámetros que se emplean son: composición de la fase móvil, la cual consta de una mezcla de acetonitrilo (ACN) y buffer fosfato (PO₄)⁻ a pH 5 en relación 65/35, flujo de fase móvil 1mL/min, presión 800 PSI, columna analítica C₁₈ de fase reversa y la elusión de los analitos se realizó de forma isocrática.

Condiciones para el análisis por espectrometría de masas (MS)

Para el análisis por espectrometría de masas se empleó un sistema LCQ FLET (Thermo scientific), con ionización por Electrospray (ESI), analizador de trampa de iones [17]. Para el proceso de ionización se empleó un modo ESI de ionización positivo, energía de ionización 70 V, se utilizó como agente ionizante ácido fórmico 0,1% y el volumen de inyección de 0,2 µL/min. Fuente de ionización por electro spray 5,89 kV, corriente spray 4,27 µA, flujo de gas argón 31,02 L/min, flujo de gas auxiliar 5,99 L/min, voltaje de capilar 19,97 V, temperatura de 240,03 °C, lentes de tubo 59,97 V. Los datos son obtenidos a través del *software* Xcalibur 4.0. Los espectros de masas de las fracciones fueron analizados y comparados con la literatura para la identificación de sus componentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras analizadas mostraron una mayor solubilidad en ACN y metanol, sin embargo, en este último resultaba una mayor cantidad de sólidos, razón por la cual el solvente más adecuado para el análisis de las muestras fue el ACN. Para realizar la determinación y comparación de cannabinoides en muestras de *Cannabis sativa* se emplearon dos tipos de productos en presentación para uso tópico y sublingual, dichas muestras se presentan como D y E respectivamente.

Para lograr las mejores condiciones de separación por cromatografía líquida de alta resolución, de las muestras, se evaluaron parámetros tales como: composición de la fase móvil ACN/PO₄ (75/25, 55/45, 65/35), flujo de la fase móvil (1.5, 1.0, 0.5) mL/min, y longitud de onda (254, 220) nm. Se inyectaron las muestras D y E variando la composición de fase móvil. El aumento de la polaridad de la fase móvil en proporción 55/45 ACN/PO₄ produjo la pérdida de algunas señales cromatográficas, también aumentó el tiempo de permanencia de los analitos en la fase estacionaria lo cual pudo ser un indicio de la poca afinidad de los compuestos presentes en la muestra con la fase móvil a estas condiciones de polaridad, presentándose un comportamiento similar en ambas muestras. La relación de fase móvil 75/25 ACN/PO₄ permitió observar una mejor resolución de las señales cromatográficas. Con la relación 65/35 de ACN/PO₄ se evidenció una mejora de las señales, mayor número de picos, buena separación y resolución de los mismos. Los tiempos de retención y orden de elución son similares a los reportados en el trabajo desarrollado por Gámbaro *et al.* [16].

Se evaluó el flujo de fase móvil a 1,5 mL/min, 1 mL/min y 0,5 mL/min respectivamente, para las muestras D y E. Para el primer ensayo (1,5 mL/min) se presenta una variabilidad significativa de la señal observándose solapamiento de los picos y poca resolución, la posible razón que se atribuye radica en que los analitos son arrastrados debido al alto flujo de fase móvil lo cual impide que estos interaccionen de forma efectiva con la fase estacionaria y se produzca la proximidad en la elución y por consiguiente el solapamiento de las señales. El flujo de 0,5 mL/min presentó ensanchamiento de los picos y tiempos de retención demasiado largos. Para el flujo de 1 mL/min, la resolución de los picos mejoró significativamente las señales fueron más claras, lo cual permite identificar algunos picos con base a lo reportado por la literatura y relacionarlos según el orden de elución con: CBD, CBN y THC.

Se evaluó la mejor longitud de onda con la cual las moléculas cannabinoides absorben energía, para ello se trabajó a longitud de onda de 254 nm ya que algunos autores reportan detección de algunos tipos de cannabinoides a esta longitud de onda [18, 19]. La longitud de onda de 254 nm mostró picos cromatográficos simétricos y buena intensidad

de las señales. Sin embargo, la longitud de onda de 220 nm mostró la mayor intensidad de los picos cromatográficos, lo cual significa lograr mayor sensibilidad. Según el trabajo de Gámbaro *et al.* [14], la longitud de onda a 220 nm es la energía óptima para que las moléculas cannabinoides absorban energía, esto se debe a la estructura química de estos compuestos y el tipo de insaturaciones, propias de anillos aromáticos y dobles enlaces en las estructuras de compuestos cannabinoides. Estos ensayos permitieron establecer las mejores condiciones cromatográficas de flujo 1 mL/min, fase móvil de ACN-buffer (PO₄) pH 5, 65/35, longitud de onda $\lambda = 220$ nm, presión 800 PSI, tiempo de corrida de 15 minutos y volumen de inyección de 10 μ L. La figura 2 muestra los cromatogramas de las muestras D y E en las mejores condiciones establecidas.

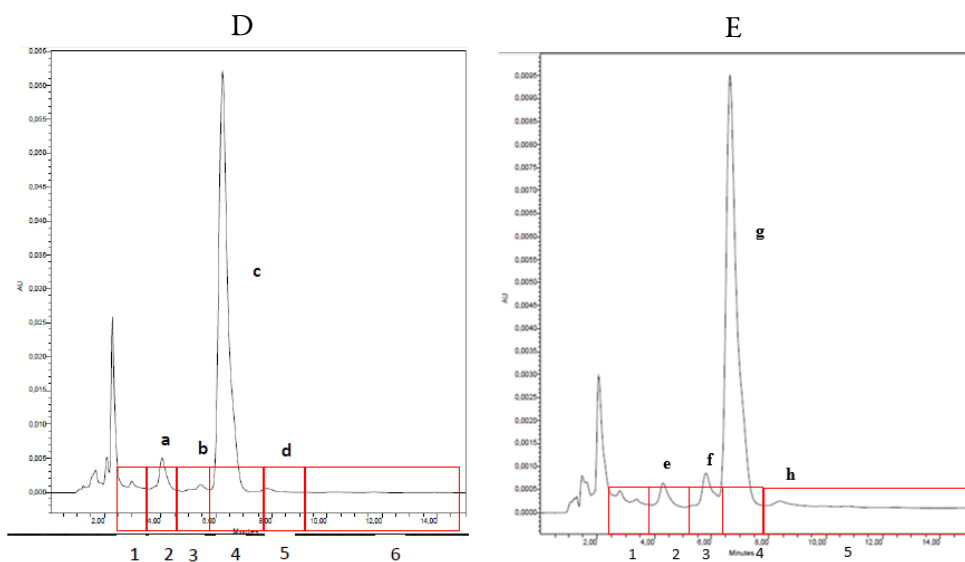


Figura 2. Cromatograma de las muestras D y E en las mejores condiciones establecidas.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo como flujo, composición de fase móvil, longitud de onda, concentración de la muestra y reproducibilidad de las medidas, se calcularon parámetros cromatográficos con el fin de evaluar las velocidades promedio de migración de soluto, el factor de retención y coeficiente de selectividad de los analitos en la fase estacionara. Estos datos permiten comprender el comportamiento de los analitos durante la separación de los mismos.

El tiempo muerto (t_m), el cual se define como el tiempo que tarda un analito no retenido en llegar al detector se determinó utilizando una solución de dicromato de potasio a una concentración de 0,1 N, para el cual se estableció un tiempo de retención $t_m = 2,029$ min. La determinación de los factores de retención y selectividad permitieron

establecer los tiempos de retención y recolección de fracciones para el posterior análisis de cada una de ellas por espectrometría de masas. La tabla 1 muestra los tiempos de retención de cada compuesto presente en las muestras D y E, los cuales sirvieron como guía para la recolección de cada fracción.

Tabla 1. Resultados: velocidad lineal promedio de migración de los solutos, factor de retención del analito, factor de selectividad muestras D y E.

| Número de pico | Tiempo de retención (min) | Velocidad promedio de migración del soluto (cm/min) | Factor de retención |
|-------------------|---------------------------|---|---------------------|
| Muestra D | | | |
| a | 4,066 | 3,691 | 0,791 |
| b | 5,450 | 2,753 | 1,412 |
| c | 6,235 | 2,411 | 1,763 |
| d | 7,785 | 1,932 | 2,455 |
| Relación de picos | | Factor de selectividad | |
| α_{b-a} | | 1,687 | |
| α_{c-b} | | 1,229 | |
| α_{d-b} | | 1,368 | |
| Muestra E | | | |
| e | 4,271 | 3,512 | 1,105 |
| f | 5,773 | 2,598 | 1,845 |
| g | 6,615 | 2,267 | 2,260 |
| h | 7,361 | 2,037 | 3,120 |
| Relación de picos | | Factor de selectividad | |
| α_{f-e} | | 1,669 | |
| α_{g-f} | | 1,224 | |
| α_{h-f} | | 1,381 | |

La separación de los picos desde el punto de vista cromatográfico es razonable ya que se espera que el factor de selectividad sea superior a la unidad, razón por la cual fue posible separar en fracciones las señales de mayor interés en el cromatograma (figura 2). De acuerdo con los tiempos de retención se establecieron intervalos para la recolección de fracciones según los picos observados en el cromatograma; esto con el

fin de poder identificar mediante espectrometría de masas (EM) los compuestos presentes en la muestra.

Se recogieron 6 fracciones cromatográficas a partir de la muestra D de la siguiente manera: fracción 1 (1,5-2,5 min), fracción 2 (2,5-3,5 min), fracción 3 (3,5-4,5 min), fracción 4 (4,5-5,5 min), fracción 5 (5,5 -7,5 min) y fracción 6 (7,5-15 min). En total se realizaron 15 inyecciones de la muestra, cada una con un tiempo de análisis de 15 minutos, recolectando el eluato de forma tal que la temperatura y la luz no afectaran la composición de la muestra. De cada una de las fracciones recolectadas se tomaron alícuotas de 2 mL para el análisis a través de espectrometría de masas, a las cuales se les adicionó ácido fórmico como agente ionizante de forma tal que la concentración de este en la muestra fuera de 0,1%.

El análisis por (EM) se inició con la inyección de un blanco de ACN con el propósito de descartar todos aquellos posibles interferentes que se puedan dar en el análisis. El espectro obtenido presentó un pico con $m/z = 124,05$ correspondiente a la molécula de ACN. Posteriormente, se inyectó una muestra del extracto de cannabis 10 mg/L (muestra D) con el objetivo de comprobar la presencia de compuestos pertenecientes a cannabis. Esta prueba arrojó resultados claros, se puede apreciar en mayor abundancia un pico con $m/z = 315,20$ (figura 3) el cual posiblemente puede corresponder a los compuestos THC o CBD, también se observó un pico a $m/z = 316,26$, que corresponde probablemente al compuesto CBG, esto de acuerdo con lo reportado por Tassi *et al.* [20] y otra señal a $m/z = 124,08$ el cual corresponde al solvente utilizado (ACN).

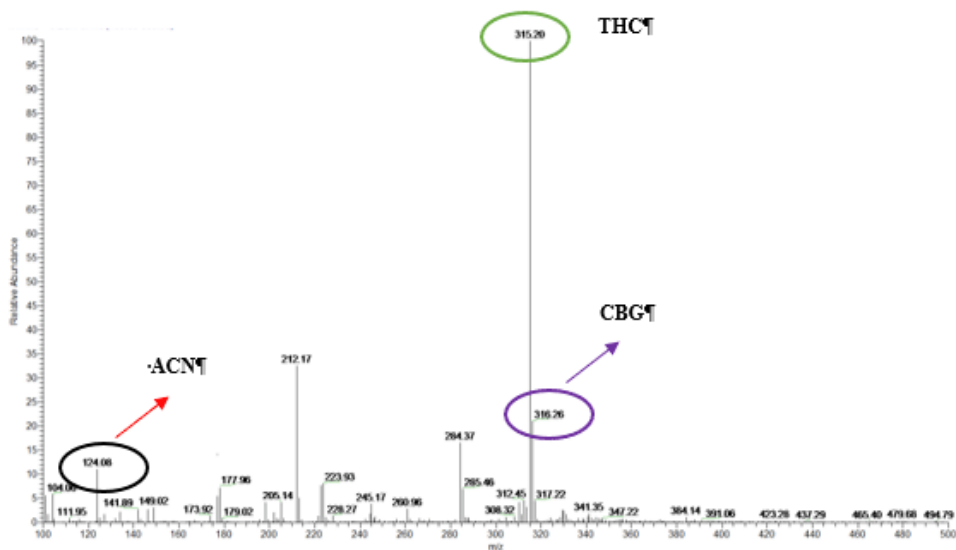


Figura 3. Espectro de masas, muestra D Cannabis 10 mg/L.

Como se puede apreciar en el espectro de masas de la figura 3, la muestra D contiene compuestos de tipo cannabinoides, como THC o posiblemente CBD, los cuales por su estructura poseen el mismo peso molecular siendo el patrón de fragmentación el parámetro que permitió diferenciar entre estos dos compuestos o mezcla racémica de los mismos [1, 2, 21, 22].

Las fracciones recolectadas y liofilizadas fueron inyectadas en el espectrómetro de masas desde la fracción 1 hasta la fracción 6 de la muestra D. El espectro de masas para la fracción 1 no mostró señales que pertenezcan a algún cannabinoide. Para la fracción 2 en el cromatograma se observó un pequeño pico, tiempo de retención comprendido entre 2,5-3,5 minutos, su espectro de masas no mostró correspondencia con algún metabolito cannabinoide. El anterior resultado es coherente ya que la intensidad de la señal en el cromatograma es muy poca. Con relación al pico $m/z = 370,80$ se ha identificado según la base de datos Nist como un posible contaminante presente en la muestra el cual puede tratarse del compuesto LOXYNIL $C_7H_3I_2NO$, $m/z = 370,9138$ [23, 24]. Los espectros de las fracciones 3 hasta la 5 se muestran en la figura 4 ya que para la fracción 6 no se encontraron señales que puedan ser asociadas a algún compuesto de *cannabis*. De acuerdo con el cromatograma de la muestra D, la fracción comprendida en el intervalo entre 3,5-4,5 minutos (fracción 3), aparece un pico el cual puede ser relacionado según el cromatograma reportado para muestras cannabinoides y de acuerdo con el orden de elución de los analitos, con la molécula de CBD.

En la figura 4a se muestra el espectro de masas para esta fracción donde se puede apreciar un pico con $m/z = 315,64$ el cual según lo reportado por Tassi *et al.* [20] puede tratarse de la molécula de THC o CBD. Esta discrepancia puede resolverse desde el punto de vista de los posibles fragmentos que se puedan generar, al analizar este factor se pueden ver picos altos $m/z = 174,41$; $230,55$ y $257,56$ los cuales corresponden a fragmentos de la molécula de CBD. Este hecho sugiere basado en el patrón de fragmentación para esta molécula [25, 26], que posiblemente en la muestra D se encuentre presente el compuesto CBD en una pequeña cantidad, lo cual está de acuerdo con la baja señal observada en el cromatograma y la pequeña abundancia de los picos en el espectro de masas.

En la fracción 4 del cromatograma hay un pico pequeño el cual puede ser asociado a la molécula de CBN, el espectro de masas de esta muestra (figura 3b) corrobora este hecho ya que se obtiene una señal a $m/z = 310,70$ y otro pico muy importante para $m/z = 296,52$ que corresponde al patrón de fraccionamiento [3, 27] de la molécula de CBN. Esto concuerda con el cromatograma para esta fracción ya que el pequeño pico correspondiente al tiempo de retención 4,5-5,5 minutos está relacionado con este compuesto. De esta manera se puede establecer la identidad de la molécula CBN y su presencia en la muestra.

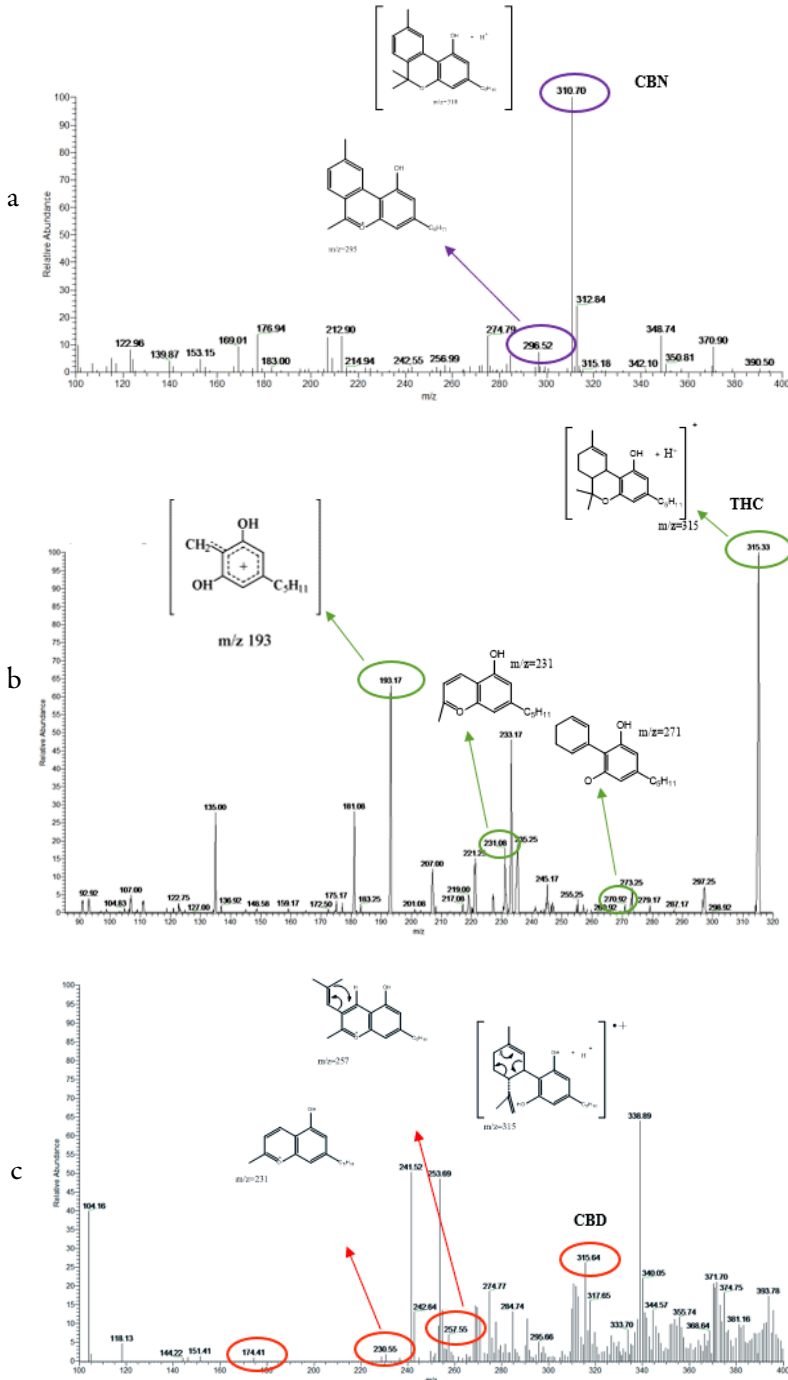


Figura 4. Espectros de masas de las fracciones 3(a), 4(b) y 5(c) de la muestra D *Cannabis sativa*.

También está presente un pico de una abundancia relativamente pequeña $m/z = 315,18$ esto se puede explicar desde el punto de vista de la proximidad de los picos en la separación cromatográfica o también por el hecho que el THC presenta características termolábiles y fotolábiles o puede presentar una disminución del contenido de THC a través de la oxidación a CBN [28]. Para la fracción 5 con tiempo de retención en el intervalo comprendido entre 5,5-7,5 minutos se tiene el pico con mayor intensidad en el cromatograma, y de acuerdo con los trabajos realizados por Gámbaro, Jamwal, Mechtler y sus respectivos colaboradores [14, 29, 30] corresponde a la molécula de THC. Lo anterior se fundamenta en que el componente mayoritario de las muestras de Cannabis es el THC, esto se comprobó con el espectro de masas obtenido para esta fracción (figura 3c) donde se presenta un pico con $m/z = 315,02$. Como ya se mencionó, hay dos alternativas, puede tratarse de THC o CBD.

Como en los casos anteriores, el parámetro que permite identificar la molécula son las fragmentaciones características de cada una de ellas, en este caso para el compuesto THC existen dos tipos de isómeros para este compuesto, uno el Δ 1-2 THC, y el Δ 1-6 THC. Como se puede apreciar en el espectro de masas para esta fracción se presentan picos a $m/z = 270,92, 231,08$ y el más importante a considerar $m/z = 193,17$, estos se relacionan con el patrón de fragmentación perteneciente a THC [29-34]. Lo anterior permite deducir que en la muestra posiblemente se encuentra presente el isómero Δ 1-6 THC. En la fracción 6 de la separación cromatográfica, comprendida en el intervalo 7,5-15 minutos, no se presentaron compuestos cannabinoides.

De acuerdo con los resultados de cada una de las fracciones, las cuales fueron analizadas por espectrometría de masas, se puede afirmar que la muestra D presenta los metabolitos cannabinoides asociados a posibles efectos benéficos sobre la salud en el tratamiento de diferentes patologías como ha sido reportado a través de diversos estudios a nivel mundial [35-41]. En este caso se encontró que la muestra contiene los compuestos CBD, CBN y en mayor cantidad THC como era de esperarse según lo reportado por la literatura, además se verificó en el análisis cromatográfico y en la espectrometría de masas que en la muestra se presenta una mayor abundancia para el compuesto con $m/z = 315$, el cual corresponde a la molécula de THC. Sin embargo, desde otro punto de vista, esto representaría un punto de controversia ya que el compuesto THC, a pesar de tener efectos beneficiosos sobre la salud, tiene un elevado efecto psicotrópico, esto desde el punto de vista legal podría ser una limitante para la fabricación de este tipo de productos y más aún si estos no cuentan con ningún tipo de prescripción médica ni contenido de la composición detallada de los compuestos de tipo cannabinoides presentes en el producto.

El análisis de la muestra D se hizo empleando las mismas condiciones cromatográficas e inyecciones de la muestra a una concentración de 100 mg/L. El cromatograma

(figura 2) de la muestra E presenta características similares al cromatograma de la muestra D, sin embargo, puede apreciarse una diferencia en cuanto a la intensidad de los picos con relación al compuesto CBD, ya que su intensidad es considerablemente más pequeña que la obtenida en la muestra D, esto puede ser indicativo de una menor cantidad de este compuesto en la muestra. Es importante destacar que cada una de las inyecciones para la recolección de las fracciones presentó reproducibilidad de las señales y tiempos de retención, los cuales fueron definidos para la obtención de las fracciones.

De forma similar a lo realizado con la muestra D se calcularon los parámetros cromatográficos con base en el cromatograma obtenido para la muestra E (figura 2). Respecto a los datos obtenidos de factor de retención (1,105-3,120) y factor de selectividad (1,224-1,669), estos son muy similares a los de la muestra D en relación a magnitud ya que en ambas muestras los cromatogramas son similares. Sin embargo, se muestra una ligera variación en cuanto a la retención relativa de la muestra E ya que para el último pico este se encontraría más retenido a la fase estacionaria lo cual puede ser explicado de acuerdo con la polaridad de la especie presente en esta parte del cromatograma. Para la muestra E se recogieron las siguientes fracciones: fracción 1 (2,5-3,5 min), fracción 2 (3,5-5,0 min), fracción 3 (5,0-6,0 min), fracción 4 (6,0-8,0 min), fracción 5 (8,0 -15 min). El análisis del espectro de masas de la muestra E se inició con la inyección de un blanco de ACN, esta es la fase móvil de trabajo, en el espectro de masas de dicha muestra no se observan picos de importancia a excepción del pico con $m/z = 124,08$, el cual como ya se mencionó corresponde al solvente.

Los resultados para esta fracción son los esperados, teniendo en cuenta que el cromatograma de la muestra E (figura 2) los picos son de una intensidad muy baja e incluso menores en intensidad a la señal del solvente. De forma similar a lo experimentado con la muestra D, se efectuó la inyección de una muestra de cannabis (muestra E) con el fin de identificar los componentes presentes, este fue un indicio para la recolección de las fracciones. Los resultados del espectro de masas de esta muestra mostraron picos a $m/z = 315,72$ para el cual existe la posibilidad que se trate de las moléculas THC o CBD. También se observaron picos para $m/z = 316,79$ y $310,80$, los cuales están asociados a CBG y CBN respectivamente.

El espectro de masas de la fracción 1 de la muestra E presentó un pico prominente a $m/z = 370,55$, el cual posiblemente este asociado a un contaminante como se mencionó anteriormente. De acuerdo con los resultados para esta fracción son coherentes con los picos presentes en el cromatograma para la muestra E ya que no se presenta un tipo de pico con una absorción intensa en esta región del cromatograma 2,5-3,5 minutos. El espectro de masas de la fracción 2, para el cual se apareció un pico para $m/z = 315$, puede estar relacionado con la molécula de THC o CBD, sin embargo, de acuerdo

al cromatograma para esta muestra, indica que para la fracción 2 probablemente esté presente el compuesto CBD de acuerdo con la elución analizada. Lo anterior se pudo comprobar al estudiar su espectro de masas ya que se presentan fragmentaciones típicas para este compuesto a $m/z = 174,98$; $258,52$ y $272,63$, lo cual permite comprobar la existencia de este compuesto en la muestra de acuerdo con su patrón de fragmentación.

Respecto a los espectros de la fracción 3 muestra D y la fracción 2 muestra E, los cuales están relacionados con la misma molécula CBD se puede apreciar que para el primero aparentemente habría una mayor cantidad del cannabinoide debido a que la señal es más abundante para el pico a $m/z = 315$, sin embargo, las fragmentaciones de este son de poca intensidad si se relacionan con la muestra E, fracción 2, para la cual la intensidad de $m/z = 315$ es inferior, esto puede ser indicativo de que la mayor parte de la molécula se rompe para generar este tipo de iones. Al comparar estos resultados se obtiene una mayor abundancia del cannabinoide CBD en la muestra D, esto puede estar asociado a diversos factores como la edad de la planta, condiciones ambientales, condiciones de extracción o el almacenamiento que haya tenido el material vegetal hasta la elaboración del producto.

Desde el punto de vista terapéutico esto es importante ya que la muestra D a pesar del alto contenido de THC tiene mayor cantidad de CBD en comparación con la muestra E; el CBD no presenta efectos de droga sobre el consumidor, pero si presenta efectos beneficiosos sobre pacientes con problemas como falta de sueño, pérdida de apetito y también en enfermedades como la esclerosis múltiple [36, 42]. En la fracción 3 de la muestra E se presentó un pico con $m/z = 310,81$, que corresponde a la molécula de CBN, y un pico con $m/z = 295,13$ el cual guarda relación con este compuesto ya que es una fragmentación del mismo, este tipo de comportamiento valida el hecho de que en la fracción obtenida por CLAR en el intervalo de 5-6 minutos se encuentra presente el compuesto CBN. Esta señal cromatográfica está relacionada con esta biomolécula.

En este orden de ideas si se comparan los resultados de las muestras E y D para el compuesto CBN, el cromatograma para la muestra E muestra una mayor intensidad de pico lo cual se ve reflejado en el espectro de masas para la fracción 3, mostrando mayor abundancia del pico característico y la fragmentación perteneciente a este compuesto, esto representa posiblemente una mayor abundancia de CBN en la muestra E.

En la fracción 4 del análisis cromatográfico, en el intervalo de tiempo que abarca de 6-8 minutos, se encontraron picos correspondientes a la molécula de THC con m/z

= 315,17 y los tipos de fragmentaciones que confirman la presencia de este compuesto a $m/z = 193,21, 258, 66$ y $299,06$, comprobando de esta manera que en la fracción se encuentra el compuesto THC y que de acuerdo con este patrón de fragmentación se trataría del isómero Δ 1-6 THC [33].

La baja abundancia de los picos puede indicar una menor cantidad del compuesto THC en la muestra E, desde el punto de vista cromatográfico, esto no concuerda con la intensidad de dicho pico en este intervalo de tiempo de retención, ya que se presenta como un pico agudo y de un área relativamente superior al resto de señales, lo cual lleva a pensar la influencia de la estabilidad de la muestra ya que parte del THC se puede transformar a CBN. Esto tendría sentido ya que como se analizó la cantidad de CBN es considerablemente alta para la muestra E si se tiene en cuenta la señal que se presenta, o simplemente la cantidad de este compuesto en la muestra E es inferior al observado en la muestra D.

Lo anterior es una variable de gran importancia a considerar ya que el producto tendría una menor eficiencia sobre el tratamiento para el cual es formulado, teniendo en cuenta que el THC a pesar de su efecto psicoactivo tiene una acción sinérgica con el compuesto CBD sobre el tratamiento de algunas enfermedades específicas como falta de sueño, pérdida del apetito entre otras [43]. De acuerdo con esto representaría una limitante desde el punto de vista que este producto no cumpliría con la acción y efecto con el cual es comercializado. Para la fracción 5 presentó un pico para $m/z = 124,02$, el cual corresponde a la fase móvil ACN. Partiendo del hecho de que los resultados del análisis espectrométrico sugiere que posiblemente estaría presente el isómero Δ 1-6 THC en las dos muestras comerciales estudiadas, esto implicaría que dichas muestras tendrían un efecto sobre el tratamiento de patologías cardíacas como también sobre trastornos como la falta de apetito o pérdida del sueño según estudios realizados por Li y Grotenhermen, Russo, Velasco *et al.* [38, 44, 45], lo cual representa un aspecto positivo sobre el uso de estos productos. Teniendo en cuenta que los cromatogramas obtenidos para las dos muestras analizadas en este estudio son similares en cuanto a variables como intensidad y tiempos de retención, se pudo encontrar a través del análisis de espectrometría de masas que se presentan variaciones en cuanto al contenido de THC, CBD y CBN en las muestras. Con base en los resultados ya mencionados relacionados con la presencia de compuestos de tipo cannabinoides en las dos muestras estudiadas, para hacer más claro el análisis realizado para cada una de las fracciones obtenidas por CLAR en la tabla 2 se presentan las masas específicas y fragmentaciones obtenidas para cada compuesto.

Tabla 2. Cannabinoides presentes en las muestras D y E. "x" = cannabinoide presente.

| <i>m/z</i> | THC 315 | Iones producto | CBD 315 | Iones producto | CBN 310 | Iones producto | CBG 316 | Iones producto |
|------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
| Muestra D | x | --- | | | | | x | --- |
| Fracción 1 | --- | --- | | | | | --- | --- |
| Fracción 2 | --- | --- | | | | | --- | --- |
| Fracción 3 | | --- | x | 174,41; 230,55; 257,56 | --- | | | |
| Fracción 4 | | | | --- | x | 256,52 | --- | |
| Fracción 5 | x | 193,17; 231,08; 270,92 | --- | --- | --- | | | |
| Fracción 6 | --- | --- | --- | --- | | | | |
| Muestra E | x | --- | --- | 174,29 | x | --- | x | --- |
| Fracción 1 | --- | | --- | | --- | | --- | |
| Fracción 2 | | --- | x | 174,98; 258,52; 272,63 | --- | | | |
| Fracción 3 | | | | --- | x | 296,13 | | |
| Fracción 4 | x | 193,21; 258,86; 299,06 | --- | | | | | |
| Fracción 5 | --- | --- | --- | | | | | |

CONCLUSIONES

Se logró identificar mediante la implementación de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas los compuestos THC, CBD, CBN, esto fue posible al comparar los resultados con estudios publicados sobre este tipo de compuestos, lo cual representa una buena aproximación para conocer la composición real en dos muestras comerciales de *Cannabis sativa* producidos en el departamento del Cauca.

La comparación entre los cromatogramas obtenidos para las dos muestras estudiadas y el reportado en la literatura fue el primer indicio para determinar la identidad de los compuestos cannabinoides, ya que proporcionó las bases que permitieron relacionar datos con los obtenidos experimentalmente y de esta manera poder establecer en primera medida la existencia de estos compuestos.

El análisis por espectrometría de masas fue fundamental para la identificación de los compuestos cannabinoides ya que mostró señales en el espectro de masas características para estos metabolitos, lo cual permitió establecer criterios a partir de la masa específica para cada compuesto y las fragmentaciones que permiten elucidar la estructura de una molécula afirmando su existencia y abundancia de estos compuestos en la muestra. Se pudo determinar cualitativamente de acuerdo con los patrones de fragmentación y la abundancia de los picos para THC, que la muestra D posiblemente presenta un mayor contenido de este cannabinoide, pero en menor proporción CBD. Según los patrones de fragmentación se tiene que en las dos muestras analizadas posiblemente se encuentre el isómero Δ 1-6 THC el cual según estudios reportados presenta actividad sobre enfermedades cardiacas y en específico sobre afecciones sobre el sistema circulatorio, por lo tanto, las muestras analizadas posiblemente tendrían algún efecto sobre el tratamiento de estas enfermedades. Se logró identificar mediante el patrón de fragmentación que el compuesto CBN, al igual que THC y CBD están presentes en ambas muestras, sin embargo, de acuerdo con la abundancia de los picos para CBN este compuesto estaría presente 56 veces en mayor proporción en la muestra E lo que implicaría que esta muestra presente mayor actividad para este metabolito en comparación con la muestra D.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Cauca, Colombia, y su Vicerrectoría de Investigaciones por financiar el proyecto VRI-4961 en los cuales se enmarca este artículo, a los grupos de investigación QPN, GIQA del departamento de Química y personal docente por su apoyo en la realización de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. J.K. Booth, J. Bohlmann, Terpenes in *Cannabis sativa* - From plant genome to humans, *Plant Sci.*, **284**, 67-72 (2019).
2. Y. Zhou, S. Wang, H. Lou, P. Fan, Chemical constituents of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity, *Phytochem. Lett.*, **23**, 57-61 (2018).

3. F. Cascini, I. Boschi, Tetrahydrocannabinol concentration and genetic characterization of Cannabis, en: *Handbook of Cannabis and Related Pathologies Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*, Academic Press, Elsevier Inc., 2017.
4. M.A. ElSohly, D. Slade, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Sci.*, **78**(5), 539-548 (2005).
5. J.A. Hartsel, J. Eades, B. Hickory, *Cannabis sativa* and Hemp. En: *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, Chapter 53, Elsevier Inc., 2016.
6. R.A. Sansone, L.A. Sansone, Marijuana and body weight, *Innov. Clin. Neurosci.*, **11**(7-8), 50-54 (2014).
7. S. Pinar-Sueiro, R. Rodríguez-Puertas, E. Vecino, Cannabinoid applications in glaucoma, *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, **86**(1), 16-23 (2011).
8. T. Dale, J. Downs, H. Olson, A. M. Bergin, S. Smith, H. Leonard, Cannabis for refractory epilepsy in children: A review focusing on CDKL5 deficiency disorder, *Epilepsy Res.*, **151**, 31-39 (2019).
9. F. Grotenhermen, K. Müller-Vahl, Das therapeutische Potenzial von Cannabis und Cannabinoiden, *Dtsch. Arztebl. Int.*, **109**(29-30), 495-501 (2012).
10. R. Abuhasira, L. Shbiro, Y. Landschaft, Medical use of cannabis and cannabinoids containing products. Regulations in Europe and North America, *Eur. J. Intern. Med.*, **49**, 2-6 (2018).
11. C. Nucci, M. Bari, A. Spanò, M. Corasaniti, G. Bagetta, M. Maccarrone, L.A. Morrone, Potential roles of (endo)cannabinoids in the treatment of glaucoma: from intraocular pressure control to neuroprotection, *Prog. Brain Res.*, **173**(8), 451-464 (2008).
12. M.A.P. Bloomfield, C. Hindocha, S.F. Green, M.B. Wall, R. Lees, K. Petrilli, H. Costello, M.O. Ogunbiyi, M.G. Bossong, T.P. Freeman, The neuropsychopharmacology of cannabis: A review of human imaging studies, *Pharmacol. Ther.*, **195**, 132-161 (2019).
13. T. Byars, E. Theisen, D.L. Bolton, Using Cannabis to treat cancer-related pain, *Semin. Oncol. Nurs.*, **35**(3), 300-309 (2019).
14. V. Gambaro, L. Dell'Acqua, F. Farè, R. Frolidi, E. Saligari, G. Tassoni, Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection, *Anal. Chim. Acta*, **468**(2), 245-254 (2002).

15. F. Palazzoli, C. Citti, M. Licata, A. Vilella, L. Manca, M. Zoli, M.A. Vandelli, F. Forni, G. Cannazza, Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of CBD, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **150**, 25-32 (2018).
16. S.B. Grauwiler, A. Scholer, J. Drewe, Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of *Cannabis sativa* extracts, *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **850**(1-2), 515-522 (2007).
17. S. Pichini, E. Marchei, S. Martello, M. Gottardi, M. Pellegrini, F. Svaizer, A. Lotti, M. Chiarotti, R. Pacifici, Identification and quantification of 11-nor- δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide (THC-COOH-glu) in hair by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential hair biomarker of cannabis use, *Forensic Sci. Int.*, **249**, 47-51 (2015).
18. A. Hazekamp, A. Peltenburg, R. Verpoorte, C. Giroud, Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from *Cannabis sativa* L., *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **28**(15), 2361-2382 (2005).
19. B. Patel, D. Wene, Z.T. Fan, Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **146**, 15-23 (2017).
20. B. Tassi-Borille, M. González, L. Steffens, R. Scorsatto-Ortiz, R. Pereira-Limberger, *Cannabis sativa*: A systematic review of plant analysis, *Drug Anal. Res.*, **1**(1), 1-23 (2017).
21. R.E. Deimler, T.T. Razunguzwa, B.R. Reschke, C.M. Walsh, M.J. Powell, G.P. Jackson, Direct analysis of drugs in forensic applications using laser ablation electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LAESI-MS/MS), *Anal. Methods*, **6**(13), 4810-4817 (2014).
22. D. Wianowska, A.L. Dawidowicz, M. Kowalczyk, Transformations of tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extraction from *Cannabis sativa* L., *J. Anal. Chem.*, **70**(8), 920-925 (2015).
23. F. Erdmann, G. Rochholz, H. Schütz, Retention-indices on OV-1 of approximately 170 commonly used pesticides, *Mikrochim. Acta*, **106**(3-6), 219-226 (1992).

24. K.O. Oliveira, A.R.M. Silva, B.F. da Silva, H.M.S. Milagre, C.D.F. Milagre, Insights into the microbial degradation pathways of the ioxynil octanoate herbicide, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **13**, 258-264 (2018).
25. F.J.E.M. Kupperts, C.A.L. Bercht, C.A. Salemink, J.K. Terlouw, W. Heerma, *Pyrolysis of cannabidiol. Structure elucidation of four pyrolytic products*, Laboratory of Organic Chemistry, State University of Utrecht, The Netherlands, vol. 458, 1975, pp. 3669-3684.
26. F. Palazzoli, C. Citti, M. Licata, S. Vilella, L. Manca, M. Zoli, M.A. Vandelli, F. Forni, G. Cannazza, Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), D⁹-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **150**, 25-32 (2018).
27. T.B. Vree, Mass spectrometry of cannabinoids, *J. Pharm. Sci.*, **66**(10), 1444-1450 (1977).
28. Z. Bruci, I. Papoutsis, S. Athanaselis, P. Nikolaou, E. Pazari, C. Spiliopoulou, G. Vyshka, First systematic evaluation of the potency of *Cannabis sativa* plants grown in Albania, *Forensic Sci. Int.*, **222**(1-3), 40-46 (2012).
29. R. Jamwal, A.R. Topletz, B. Ramratnam, F. Akhlaghi, Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids, *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1048**, 10-18 (2017).
30. K. Mechtler, J. Bailer, K. De Hueber, Variations of Δ^9 -THC content in single plants of hemp varieties, *Ind. Crops Prod.*, **19**(1), 19-24 (2004).
31. D.M. Andrenyak, D.E. Moody, M.H. Slawson, D.S. O'Leary, M. Haney, Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-11-nor-9-carboxy-THC and Cannabidiol in human plasma using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Toxicol. Anal.*, **41**, 277-288 (2017).
32. L.V. Tose, N.A. Santos, R.R.T. Rodrigues, M. Murgu, A.F. Gomes, G.A. Vasconcelos, P.C.T. Souza, B.G. Vaz, W. Romão, Isomeric separation of cannabinoids by UPLC combined with ionic mobility mass spectrometry (TWIM-MS). Part I, *Int. J. Mass Spectrom.*, **418**, 112-121 (2017).

33. T.B. Vree, D.D. Breimer, C.A.M. Van Ginneken, J.M. Van Rossum, R.A. De Zeeuw, A.H. Witte, Identification of cannabivarin in hashish by a new method of combined gas chromatography-mass-spectrometry, *Clin. Chim. Acta*, **34**(2), 365-372 (1971).
34. C. Coulter, M. Garnier, C. Moore, Analysis of tetrahydrocannabinol and its metabolite, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, in oral fluid using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, **36**(6), 413-417 (2012).
35. M.S. Aymerich, E. Aso, M.A. Abellanas, R.M. Tolon, J.A. Ramos, I. Ferrer, J. Romero, J. Fernández-Ruiz, Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system, *Biochem. Pharmacol.*, **157**, 67-84 (2018).
36. M. Ben Amar, Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential, *J. Ethnopharmacol.*, **105**(1-2), 1-25 (2006).
37. M. Ganzera, S. Sturm, Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. An update covering 2011–2016, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **147**, 211-233 (2018).
38. G. Velasco, S. Hernández-Tiedra, D. Dávila, M. Lorente, The use of cannabinoids as anticancer agents, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **64**, 259-266 (2016).
39. D. Baker, G. Pryce, G. Giovannoni, A.J. Thompson, The therapeutic potential of cannabis, *Lancet Neurol.*, **2**(5), 291-298 (2003).
40. M. Felli, S. Martello, M. Chiarotti, LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests, *Forensic Sci. Int.*, **204**(1-3), 67-73 (2011).
41. N. Maurya, B.K. Velmurugan, Therapeutic applications of cannabinoids, *Chem. Biological. Interactions*, **293**, 77-88 (2018).
42. V. Chiurchiù, M. Van Der Stelt, D. Centonze, M. Maccarrone, The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation in multiple sclerosis: Clues for other neuroinflammatory diseases, *Prog. Neurobiol.*, **160**, 82-100 (2018).
43. S.P.H. Alexander, Therapeutic potential of cannabis-related drugs, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **64**, 157-166 (2016).

44. D.M. Li, C.K. Ng, Effects of delta 1- and delta 6-tetrahydrocannabinol on the adenylate cyclase activity in ventricular tissue of the rat heart, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **11**(1), 81-85 (1984).
45. F. Grotenhermen, E. Russo, *Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*, Haworth Integrative Healing Press, 2002.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.M. Giraldo, R. Benítez-Benítez, R.A. Sarria-Villa, P.A. Arango, J.M. Franco, Determinación y comparación cualitativa de cannabinoides presentes en productos naturales comerciales del departamento del Cauca, Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 789-810 (2019).

REV. COLOMB. CIENC. QUÍM. FARM.,
VOL. 48, NÚMEROS 1 A 3, 2019.

ÍNDICE GENERAL POR TIPO DE ARTÍCULOS

Artículos de investigación científica

- Dos distúrbios psiquiátricos para a antibioticoterapia: Reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano
William Gustavo Lima, Maria Cristina Ramos-Alves, Adriana Cristina Soares 5
- 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-Daza, Cira Anaya-Ortega, Maicol Ahumedo-Monterrosa, Ricardo Gaitan-Ibarra, Jorge Anaya-Gil 44
- Estudio fitoquímico de hojas de *Cavendishia compacta* (ERICACEAE) y evaluación de su actividad antiinflamatoria
Sorannly Paola Vasco Zamudio, William Fernando Castrillón Cardona, Javier Andres Matulevich Pelaez, Laura Ximena Díaz Barrera 61
- Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavon) “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 *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (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
- CdCl₂ has zero-order kinetic cellular influx and induces cytotoxicity and genotoxicity at low concentrations in human leukocytes *in vitro*
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, Sílvio 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, Sílvio C. de Oliveira, Olga Luganska,
Vasyl Lorents, Olga V. Pishak, Roman R. Boychuk, Petro I. Yagodynets' 170
- Estudio computacional de la reactividad y propiedades fisicoquímicas del eugenol, 2-metoxi-4-oxiranilmetilfenol y quinona metilada
Jhonatan Rabanal 245
- Measurement and correlation of solubility of ethylparaben in pure and binary solvents and thermodynamic properties of solution
Alba Miledy Romero Nieto, Nestor E. Cerquera, Daniel Ricardo Delgado 332
- Effect of *Lippia alba* essential oil administration on obesity and T2DM markers in Wistar rats
María Victoria Acevedo-Estupiñan, Elena Stashenko, Fernando Rodríguez-Sanabria 411
- Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L.
Mabel Rosalía Gruszycki, Gabriela Malena Valenzuela, Margarita Báez,
Pedro Daniel Leguiza, Ana Elena Gruszycki, Daniel Andrés Alba 425
- Thermal analysis of some novel pyrimidine derivatives
Shipra Baluja, Rahul Bhalodia, Ravi Gajera, Mehul Bhatt, Kapil Bhesaniya 436
- A descrição matemática do desempenho eletroanalítico do compósito poli(alaranjado da acridina) – oxihidróxido de vanádio na detecção eletroreduzida da entacapona
Volodymyr V. Tkach, Sílvio C. De Oliveira, Marta V. Kushnir, Oleksandr A. Brazhko,
Hélder Briosa e Gala, Olga V. Luganska, Petro I. Yagodynets' 455
- Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela
Franklin Pacheco-Coello, Doralys Ramírez-Azuaje, Ibis Pinto-Catari,
María Peraza-Marrero, Corymar Orosco-Vargas 521
- Thermodynamic analysis of celecoxib in amphiprotic and amphiprotic—aprotic solvent mixtures at several temperatures
M. Ángeles Peña, Begoña Escalera, Norma Torres 528

- Descripción teórica de la posibilidad de la detección electroquímica de la gabapentina, asistida por CoO(OH)
Volodymyr Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Olga Luganska, Hélder Brios e Gala, Karina V. Palamarek, Inna P. Danyliuk, Petro I. Yagodynets ' 547
- Síntesis, caracterización y evaluación farmacológica de nuevos complejos metálicos derivados de híbridos heteroaromáticos (benzimidazol/oxadiazol)
Ingri Y. Váquiro-Reyes, Alberto Aragón-Muriel, Dorian Polo-Cerón 557
- Aplicación de un diseño factorial 2³ en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*
Wilson Ávila Ávila, Oscar J. Medina Vargas, Lucía M. Moreno Bastidas 643
- A descrição teórica da detecção eletroanalítica do letrozol, assistida pelo compósito VO(OH) – polipirrol, obtido catodicamente
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Nataliia M. Storoshchuk, Sílvio C. De Oliveira, Olga V. Luganska, Vira V. Kopiika, Hélder Brios e Gala, Ali Baddouh, Petro I. Yagodynets ' 662
- Análisis por FTIR y DSC de complejos polielectrolito entre Eudragit® E100 y ácido benzoico como evidencia de hidrólisis de los grupos éster del polímero
Leidy J. Dallos, Rubén H. Manzo, Yolima Baena 700
- Volumetric behaviour of tetra-*n*-butyl ammonium bromide in various solvents at different temperatures
Shipra Baluja, Elham Abdullah Mo Alnayab 722
- Artículos de investigación tecnológica**
- 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
- Extracción de glicoalcaloides de papa nativa (*Solanum phureja*) variedad ratona morada con líquidos presurizados
Soany Eraso-Grisales, Diego Mejia-España, Andrés Hurtado-Benavides 181
- Adulterantes presentes en plantas medicinales de mercados municipales en Costa Rica
Montserrat Madrigal-De la Selva, Andrés Mata-Monge, Sergio González-Suarez, Ramsés Alfaro-Mora 385

- Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos)
Anthony Lopez, Katerine Herazo, Reinaldo G. Sotomayor 589
- A prototype of a low-cost eyelid cleaning foaming solution for symptom management in patients with chronic blepharitis: An I-optimal mixture experimental design
Francisco Javier Burgos-Flórez, Roxana De las Salas 615
- Development of a new Colombian product, effective for the treatment of carious lesions: Case study
Milton Enrique Londoño-Lemos, Ocar Bustamante 677
- Potentialities of the Colombian propolis in pharmaceuticals and cosmetics: A standpoint from the quality control
Yuly Ximena Correa-González, Maritza Adelina Rojas-Cardozo, Claudia Elizabeth Mora-Huertas 762
- Determinación y comparación cualitativa de cannabinoides presentes en productos naturales comerciales del departamento del Cauca, Colombia
Johnnatan Mauricio Giraldo, Ricardo Benítez Benítez, Rodrigo Andrés Sarria-Villa, Paola Andrea Arango, Jaime Martin Franco 789
- Artículos de investigación clínica**
- 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
- Caracterización de la prestación del servicio farmacéutico en el departamento de Sucre, Colombia
David Galván Borja, Rina Martínez Cardeño, José Luis Macareno Barvo, Nerlis Pájaro Castro 314
- Caracterización de las conductas de consumo de medicamentos en estudiantes universitarios de Costa Rica
Daniel Sebastián Ríos Mateus, Karolina Monge Arce, Sofía Chavarría Arrieta, Ramsés Alfaro Mora 348

| | |
|---|-----|
| Analysis of the reports sent to an institutional patient safety program Yira Constanza Cortázar, José Gilberto Orozco, José Julián López | 396 |
| Impacto de la restricción al uso de medicamentos en un hospital de alta complejidad Laura M. Rendón, Esteban Agudelo, Naira Y. Valencia | 467 |
| Complejidad de la transición de los esquemas antirretrovirales en un programa de atención de VIH en Bogotá durante el periodo de 2015 a 2017 Leonardo Arévalo-Mora, Sonia Moscoso, Alcides Acosta, Mónica Mantilla | 505 |
| Artículos de revisión | |
| Essential oils as a source of bioactive molecules Glicerio Leon-Mendez, Nerlis Pajaro-Castro, Enilson Pajaro-Castro, Miladys Torrenegra-Alarcón, Adriana Herrera-Barros | 80 |
| Sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables: una plataforma de desarrollo alternativa para la industria farmacéutica colombiana Yeimy L. Cueto, Wilfrido L. Ortega, Reinaldo G. Sotomayor | 260 |
| Artículo de reflexión | |
| La farmacia de los medicamentos genéricos Mónica Aranda, María Ana Rosasco | 357 |
| Reporte de caso | |
| Encefalopatía por cefepima en paciente renal: una reacción adversa a medicamento Leidy Constanza Álvarez Escalante, Hernán Isaías Vargas Plazas | 372 |

ÍNDICE GENERAL DE AUTORES

| | | | |
|--|---------------|----------------------------------|-------------------------|
| Acevedo-Estupiñan, María Victoria, | 411 | Danyliuk, Inna P., | 547 |
| Acosta, Alcides, | 505 | De las Salas, Roxana, | 615 |
| Agudelo, Esteban, | 467 | De Moraes Flores, Érico Marlon, | 145 |
| Ahumedo-Monterrosa, Maicol, | 44 | De Oliveira, Silvio C., | 159, 170, 455, 547, 662 |
| Alba, Daniel Andrés, | 425 | Delgado, Daniel Ricardo, | 128, 332 |
| Alfaro Mora, Ramsés, | 348, 385 | Díaz Barrera, Laura Ximena, | 61 |
| Álvarez Escalante, Leidy Constanza, | 372 | Do Livramento de Paula, Maria, | 112 |
| Alves Fontenele, Maria, | 29, 112 | Dueñas Aragón, Marley, | 94 |
| Anaya-Gil, Jorge, | 44 | Eraso-Grisales, Soany, | 181 |
| Anaya-Ortega, Cira, | 44 | Escalera, Begoña, | 528 |
| Aragón-Muriel, Alberto, | 557 | Fontoura dos Santos, Vanessa, | 145 |
| Aranda, Mónica, | 357 | Fúnez David, Oscar David, | 128 |
| Arango, Paola Andrea, | 789 | Gaitan-Ibarra, Ricardo, | 44 |
| Arévalo-Mora, Leonardo, | 505 | Gajera, Ravi, | 436 |
| Ávila Ávila, Wilson, | 643 | Galván Borja, David, | 314 |
| Baddouh, Ali, | 662 | García Rojas, Claudia Lorena, | 128 |
| Baena, Yolima, | 700 | Giraldo, Johnnatan Mauricio, | 789 |
| Báez, Margarita, | 425 | Gongora Amaut, Nerio, | 94 |
| Baluja, Shipra, | 436, 722 | González-Suarez, Sergio, | 385 |
| Barcellos da Silva, Fabiana Ernestina, | 145 | Gruszycki, Ana Elena, | 425 |
| Barros Gomes, Paulo Roberto, | 29, 112 | Gruszycki, Mabel Rosalía, | 425 |
| Benítez Benítez, Ricardo, | 789 | Herazo, Katerine, | 589 |
| Bhalodia, Rahul, | 436 | Herrera-Barros, Adriana, | 80 |
| Bhatt, Mehul, | 436 | Hurtado-Benavides, Andrés, | 181 |
| Bhesaniya, Kapil, | 436 | Ivanushko, Yana G., | 159 |
| Boychuk, Roman R., | 170 | Kopiika, Vira V., | 662 |
| Brazhko, Oleksandr A., | 455 | Kormosh, Zholt O., | 159 |
| Briosa e Gala, Hélder, | 455, 547, 662 | Kushnir, Marta V., | 159, 170, 455, 547, 662 |
| Burgos-Flórez, Francisco Javier, | 615 | Leguiza, Pedro Daniel, | 425 |
| Bustamante, Ocar, | 677 | Leon-Mendez, Glicerio, | 80 |
| Caetano da Silva, Jeremias, | 112 | Lima, William Gustavo, | 5 |
| Calderón Ospina, Carlos Alberto, | 128 | Londoño-Lemos, Milton Enrique, | 677 |
| Castrillón Cardona, William Fernando, | 61 | López, Anthony, | 589 |
| Cerquera, Nestor E., | 332 | López, José Julián, | 396 |
| Chavarría Arrieta, Sofía, | 348 | Lorents, Vasył, | 170 |
| Correa-González, Yuly Ximena, | 762 | Luganska, Olga V., | 159, 170, 455, 547, 662 |
| Cortázar, Yira Constanza, | 396 | Macareno Barvo, José Luis, | 314 |
| Costa Louzeiro, Hilton, | 29, 112 | Madrigal-De la Selva, Monserrat, | 385 |
| Cueto, Yeimy L., | 260 | Mansur-Machado, Michel, | 145 |
| Da Silva Lyra, Wellington, | 29 | Mantilla, Mónica, | 505 |
| Dallos, Leidy J., | 700 | Manzo, Rubén H., | 700 |
| | | Martín-Franco, Jaime, | 789 |

| | | | |
|-----------------------------------|---------|------------------------------------|-------------------------|
| Martínez Cardeño, Rina, | 314 | Reis, Jonas Batista, | 29, 112 |
| Mata-Monge, Andrés, | 385 | Rendón, Laura M., | 467 |
| Matulevich-Pelaez, Javier Andrés, | 61 | Ríos-Mateus, Daniel Sebastián, | 348 |
| Medina-Vargas, Oscar J., | 643 | Rodríguez-Sanabria, Fernando, | 411 |
| Mejía-España, Diego, | 181 | Rojas-Cardozo, Maritza Adelina, | 762 |
| Mo Alnayab, Elham Abdullah, | 722 | Romero-Nieto, Alba Miledy, | 332 |
| Monge-Arce, Karolina, | 348 | Rosasco, María Ana, | 357 |
| Mora-Huertas, Claudia Elizabeth, | 762 | Rubiano-Daza, Henry, | 128 |
| Moreno-Bastidas, Lucía M., | 643 | Santos de Oliveira, Rayone Wesley, | 29, 112 |
| Moscoso, Sonia, | 505 | Sarria-Villa, Rodrigo Andrés, | 789 |
| Moucherek Filho, Victor Elias, | 29, 112 | Serpa, Elvio Adílio, | 145 |
| Orosco-Vargas, Corymar, | 521 | Soares, Adriana Cristina, | 5 |
| Orozco, José Gilberto, | 396 | Sotomayor, Reinaldo G., | 260, 589 |
| Ortega, Wilfrido L., | 260 | Souza de Oliveira, Luís Flávio, | 145 |
| Ortiz, Claudia Patricia, | 128 | Stashenko, Elena, | 411 |
| Pacheco-Coello, Franklin, | 521 | Storoshchuk, Nataliia M., | 662 |
| Pájaro-Castro, Enilson, | 80 | Tkach, Volodymyr V., | 159, 170, 455, 547, 662 |
| Pájaro-Castro, Nerlis, | 80, 314 | Torrenegra-Alarcón, Miladys, | 80 |
| Palamarek, Karina V., | 547 | Torres, Norma, | 528 |
| Parchenko, Volodymyr V., | 159 | Urbina-Daza, Adrian, | 44 |
| Peña, M. Ángeles, | 528 | Valencia, Naira Y., | 467 |
| Peraza-Marrero, María, | 521 | Valenzuela-Huamán, César Joe, | 94 |
| Pereira-Everton, Adriana, | 29 | Valenzuela-Huamán, Nelly Melinda, | 94 |
| Pinto-Catari, Ibis, | 521 | Valenzuela, Gabriela Malena, | 425 |
| Pishak, Olga V., | 170 | Valeriano-Alves, Danila Teresa, | 29 |
| Polo-Cerón, Dorian, | 557 | Váquiro-Reyes, Ingri Y., | 557 |
| Rabanal, Jhonatan, | 245 | Vargas-Plazas, Hernán Isaías, | 372 |
| Ramírez-Azuaje, Doraly, | 521 | Vasco-Zamudio, Soranlly Paola, | 61 |
| Ramos-Calcina, Alcides, | 94 | Velazque-Rojas, Lida, | 94 |
| Ramos-Alves, Maria Cristina, | 5 | Yagodynets', Petró I., | 159, 170, 455, 547, 662 |

ÍNDICE ANALÍTICO DE TÉRMINOS

Español

| | | | |
|---|----------|--|----------|
| I-butanol, | 723 | Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), | 789 |
| I-propanol, | 723 | Daño celular, | 145 |
| Aceite de árbol de té, | 616 | Daño en el ADN, | 145 |
| Aceite esencial, | 412 | Delta 9 tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC), | 789 |
| Ácido benzoico, | 700 | Diseño de mezcla, | 616 |
| Acoplamiento molecular, | 44 | Diseño factorial, | 643 |
| Actividad antibacteriana, | 557 | Diseño I-óptimo, | 616 |
| Actividad antiinflamatoria, | 61, 678 | DMT2, | 412 |
| Actividad antioxidante, | 557 | DPPH, | 643 |
| Actividad biológica, 80, | 557 | Economía de la salud, | 467 |
| Adipocitoquinas, | 412 | Economía hospitalaria, | 467 |
| Administración de los servicios de salud, | 467 | Efecto de los fármacos, | 505 |
| Adulteración de alimentos, | 385 | Efectos adversos asociados a medicamentos, | 372 |
| Agua, | 723 | Electrodos químicamente modificados, | 170, 547 |
| Análisis termogravimétrico, | 436 | Enzimas de unión a penicilinas, | 44 |
| Antioxidantes, | 425, 643 | Ericaceae, | 61 |
| Automedicación, | 128 | Errores de medicación, | 397 |
| Autoprescripción, | 128 | Espectrometría de masas (EM), | 789 |
| Betalactamasa de espectro extendido, | 44 | Espermatogénesis intraperitoneal, | 94 |
| Biodisponibilidad, | 260 | Estabilidad térmica, | 436 |
| Bioequivalencia, | 357 | Estado estacionario estable, | 170, 547 |
| Blefaritis, | 616 | Estudiantes, | 348 |
| Bromuro de tetra butilamonio, | 723 | Estudiantes universitarios, | 128 |
| Cadmio, | 145 | Etanol, | 723 |
| Calorimetría diferencial de barrido, | 436 | Etilparabeno, | 333 |
| Cannabidiol (CBD), | 789 | Eudragit® E100, | 700 |
| Cannabigerol (CBG), | 789 | Eugenol, | 245 |
| Cannabinol (CBN), | 789 | Extracción con líquido presurizado, | 181 |
| Caracterización, | 260, 529 | Extracto, | 94 |
| Cáscara de papa, | 181 | Farmacéuticos, | 763 |
| <i>Cavendishia compacta</i> , | 61 | Farmacia comunitaria, | 128 |
| Cefalosporinas, | 44, 372 | Fármacos poco solubles en agua, | 260 |
| Cefepima, | 372 | Farmacovigilancia, | 397 |
| Celecoxib, | 529 | Fenilpropanos, | 80 |
| Células de defensa, | 145 | Flavonoides, | 521 |
| Complejos lantánidos, | 557 | Gabapentina, | 547 |
| Compuestos volátiles, | 80 | Glicoalcaloides, | 181 |
| Consumo de medicamentos, | 348 | <i>Hibiscus sabdariffa</i> , | 521 |
| Control de calidad, | 385, 763 | Hidrólisis, | 700 |
| Cosméticos, | 763 | | |
| Cosolvente, | 333 | | |

| | | | |
|---------------------------------------|----------|---|--------------------|
| Ibuprofeno, | 589 | Propiedades fisicoquímicas, | 245 |
| Interacciones moleculares, | 723 | Propolis, | 763 |
| Intercambiabilidad, | 357 | Químicos farmacéuticos, | 314 |
| Inversión, | 348 | Reacciones adversas relacionadas con | |
| Investigación y desarrollo, | 678 | medicamentos, | 397 |
| Lauril sulfato sódico, | 616 | Reactividad, | 245 |
| <i>Lippia alba</i> , | 385, 412 | Regente de farmacia, | 314 |
| MAE, | 643 | Regulaciones del mercado, | 385 |
| <i>Matricaria chamomilla</i> , | 385 | Remoción químico-mecánica, | 678 |
| Medicamentos esenciales, | 467 | Restauración atraumática, | 678 |
| Medicamentos genéricos, | 357 | Sacarina, | 170 |
| Medicamentos, | 314 | Seguridad del paciente, | 397 |
| Metabolismo, | 412 | Sensor electroquímico, | 547 |
| Metanol, | 723 | Sensores electroquímicos, | 170 |
| Mezcla disolvente, | 529 | Servicio farmacéutico, | 314 |
| Negativa del paciente al tratamiento, | 505 | Servicios de salud, | 467 |
| Neurotoxicidad, | 372 | Sistema de salud, | 314 |
| Obesidad, | 412 | Sistemas de entrega de fármacos | |
| Oxihidróxido de cobalto, | 547 | autoemulsificables, | 260, 589 |
| Oxihidróxido de vanadio trivalente, | 170 | Sistemas de salud, | 467 |
| Papaína, | 678 | <i>Solanum phureja</i> , | 181 |
| Parámetros acústicos y aparentes, | 723 | Solubilidad, | 260, 333, 529, 589 |
| Parámetros cinéticos, | 436 | Solución espumosa, | 616 |
| Parámetros seminales, | 94 | Tejido carioso, | 678 |
| Parámetros termodinámicos, | 529 | Terapia antirretroviral altamente activa, | 505 |
| Patentes, | 357 | Terpenos, | 80 |
| Plantas, | 80 | Toxicidad aguda, | 94 |
| Polifenoles | 425, 521 | <i>Vaccinium meridionale</i> , | 643 |
| <i>Portulaca oleracea</i> , | 425 | Van't Hoff, | 333 |
| Potencial farmacológico, | 245 | Verdolaga, | 425 |
| Predisposición, | 348 | VIH, | 505 |
| Productos apícolas, | 763 | Yalkowsky-Roseman, | 333 |
| Productos naturales, | 80 | | |

Inglés

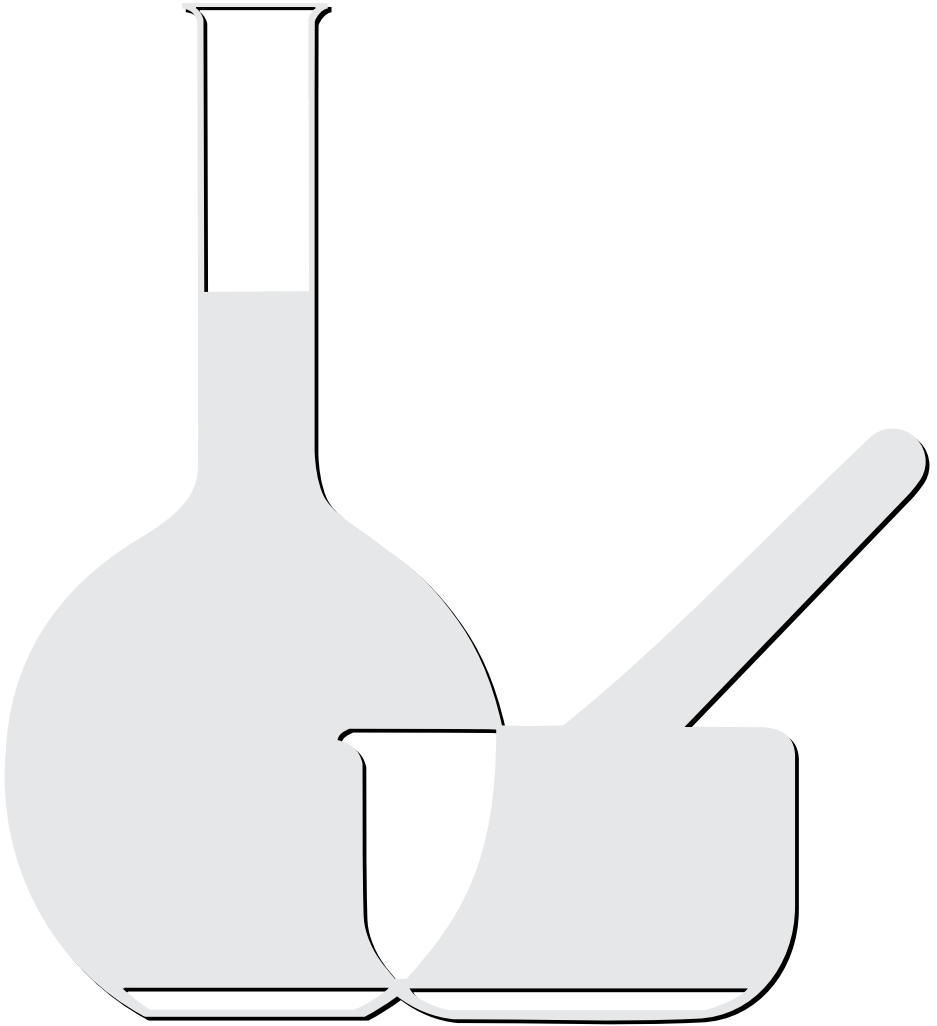
| | | | |
|---------------------------------------|--------------------|---|---------------|
| 1-butanol, | 722 | composites, | 456 |
| 1-propanol, | 722 | Conducting polymer, | 159 |
| Acoustical and apparent parameters, | 722 | Cosmetics, | 762 |
| Acute toxicity, | 94 | Cosolvent, | 332 |
| Administration of health services, | 468 | Cytokines, | 411 |
| Adulteration of food, | 386 | Defense cells, | 145 |
| Adverse drug reactions, | 396 | Delta 9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), | 790 |
| Antibacterial activity, | 558 | Differential scanning calorimetry, | 436 |
| Anti-inflammatory activity, | 61, 677 | DNA damage, | 145 |
| Antioxidant activity, | 558 | DPPH, | 644 |
| Antioxidants, | 426, 644 | Dragon's blood, | 677 |
| Antiretroviral therapy highly active, | 506 | Drug consumption, | 348 |
| <i>Artemia salina</i> , | 112 | Drug effects, | 506 |
| Ascorbic acid, | 159 | Drug repositioning, | 5 |
| Atraumatic restoration, | 677 | Efflux pumps, | 5 |
| Bacterial resistance, | 5 | Electrochemical sensors, | 159, 170, 547 |
| Bactericidal activity, | 677 | Electrooxidation, | 159 |
| Bacteriostatic activity, | 677 | Entacapone, | 456 |
| Bee products, | 762 | Equivalence, | 358 |
| Benzoic acid, | 701 | Ericaceae, | 61 |
| Bioavailability, | 261 | Essential medicines, | 468 |
| Bioequivalence, | 358 | Essential oil, | 411 |
| Biological activity, | 80, 558 | Ethanol, | 722 |
| <i>Biomphalaria glabrata</i> , | 112 | Ethylparaben, | 332 |
| Blepharitis, | 615 | Eudragit® E100, | 701 |
| Cadmium, | 145 | Eugenol, | 112, 245 |
| Cannabidiol (CBD), | 790 | Extended-spectrum beta-lactamases, | 44 |
| Cannabigerol (CBG), | 790 | Extract, | 94 |
| Cannabinol (CBN), | 790 | Extraction with pressurized liquid, | 181 |
| Carious tissue, | 677 | Factorial design, | 644 |
| <i>Cavendishia compacta</i> , | 61 | FIA-Multicomutation, | 29 |
| Cefepime, | 372 | Flavonoids, | 522 |
| Celecoxib, | 528 | Foaming solutions, | 615 |
| Cellular damage, | 145 | Gabapentine, | 547 |
| Cephalosporins, | 44, 372 | Generics drugs, | 358 |
| Characterization, | 261, 528 | Glycoalkaloids, | 181 |
| Chemically modified | | Health economics, | 468 |
| electrodes, | 170, 456, 548, 663 | Health services, | 468 |
| Chemical-mechanical removal, | 677 | Health system, | 315 |
| Cobalt(III) oxyhydroxide, | 548 | Health systems, | 468 |
| College students, | 128 | <i>Hibiscus sabdariffa</i> , | 522 |
| Community pharmacy, | 128 | HIV, | 506 |
| Conducting and semiconducting | | Hospital economics, | 468 |
| | | HPLC, | 790 |
| | | Hydrodistillation, | 112 |

| | | | |
|-------------------------------------|----------|--|-------------------------|
| Hydrolysis, | 701 | Poor water-soluble drug, | 261 |
| Ibuprofen, | 590 | <i>Portulaca oleracea</i> , | 426 |
| Interchangeability, | 358 | Potato peel, | 181 |
| Intraperitoneal, | 94 | Propolis, | 762 |
| Investment, predisposition, | 348 | Purslane, | 426 |
| I-optimal, | 615 | Quality control, | 386, 762 |
| Kinetic parameters, | 436 | Reactivity, | 245 |
| Lanthanide complexes, | 558 | Research and development, | 677 |
| Letrozol, | 663 | Saccharin, | 170 |
| <i>Lippia alba</i> , | 386, 411 | Schistosomiasis, | 112 |
| MAE, | 644 | Self-emulsifying drug delivery system, | 261, 590 |
| Market regulations, | 386 | Self-medication, | 128 |
| Mass spectrometry (MS), | 790 | Self-prescription, | 128 |
| <i>Matricaria chamomilla</i> , | 386 | Seminal parameters, | 94 |
| Medication errors, | 396 | Sequential injection analysis, | 29 |
| Medicines, | 315 | Side effects of drugs, | 372 |
| Metabolism, | 411 | Sodium diclofenac, | 29 |
| Methanol, | 722 | Sodium lauryl sulfate, | 615 |
| Mixture design, | 615 | <i>Solanum phureja</i> , | 181 |
| Molecular docking, | 44 | Solubility, | 261, 332, 528, 590 |
| Molecular interactions, | 722 | Solvent mixtures, | 528 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , | 5 | Spectrophotometry, | 29 |
| Natural products, | 80 | Spermatogenesis, | 94 |
| Neurotoxicity, | 372 | Stable steady-state, | 159, 170, 456, 547, 663 |
| Obesity, | 411 | <i>Staphylococcus aureus</i> , | 5 |
| Oxidation, | 29 | Students, | 348 |
| Papain, | 677 | Tea tree oil, | 615 |
| Patents, | 358 | Terpenes, | 80 |
| Patient safety, | 396 | Tetra butyl ammonium bromide, | 722 |
| Penicillin binding protein, | 44 | Thermal gravimetric analysis, | 436 |
| Pharmaceutical chemists, | 315 | Thermal stability, | 436 |
| Pharmaceutical service, | 315 | Thermodynamic quantities, | 528 |
| Pharmaceutics, | 762 | Treatment refusal, | 506 |
| Pharmacological potential, | 245 | Triiodide, | 159 |
| Pharmacovigilance, | 396 | Trivalent vanadium oxyhydroxide, | 170 |
| Pharmacy regent, | 315 | Type 2 diabetes mellitus, | 411 |
| Phenothiazine, | 5 | <i>Vaccinium meridionale</i> , | 644 |
| Phenylpropanes, | 80 | Van't Hoff, | 332 |
| Physicochemical properties, | 245 | Vanadium (III) oxyhydroxide, | 456 |
| Plants, | 80 | Vanadium oxyhydroxide, | 663 |
| Poly(acridine orange), | 456 | Volatile compounds, | 80, 112 |
| Polyphenols, | 426, 522 | Water, | 722 |
| Polypyrrole, | 663 | Yalkowsky-Roseman, | 332 |

Portugués

| | |
|---|---------------|
| Ácido ascórbico, | 159 |
| Análise por injeção sequencial, | 29 |
| <i>Artemia salina</i> , | 112 |
| <i>Biomphalaria glabrata</i> , | 112 |
| Bombas de efluxo, | 5 |
| Compósitos condutores e semicondutores, | 455 |
| Compostos voláteis, | 112 |
| Diclofenaco de sódio, | 29 |
| Eléttodos quimicamente modificados, | 455, 662 |
| Eletrooxidação, | 159 |
| Entacapona, | 455 |
| Espectrofotometria, | 29 |
| Esquistossomose, | 112 |
| Estado estacionário estável, | 159, 455, 662 |
| Eugenol, | 112 |

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Fenotiazina, | 5 |
| FIA-Multicomutação, | 29 |
| Hidrodestilação, | 112 |
| Letrozol, | xx9 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , | 5 |
| Oxidação, | 29 |
| Oxihidróxido de vanádio, | 455, 662 |
| Poli(alaranjado da acridina), | 455 |
| Polímero condutor, | 159 |
| Polipirrol, | 662 |
| Reposicionamento de fármacos, | 5 |
| Resistência bacteriana, | 5 |
| Sensores eletroquímicos, | 159 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> , | 5 |
| Triiodeto, | 159 |



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 Resúmo. El resumen estructurado debe describir máximo en dos frases cada uno de los siguiente elementos: el objetivo, métodos y materiales, resultados y discusión y conclusiones de la investigación. Este no debe exceder las 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 Resúmen) o Palabras chave (debajo de Resúmo). 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, Me₂CO = 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 *en cursivas*, 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 *en cursivas*, 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.org>

dat.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.° 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(3)
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.

