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: *rcciquifa_fcbog@unal.edu.co*
http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=
https://scholar.google.com/citations?user=TvBT68sAAAAJ&hl=es

Rectora Universidad Nacional de Colombia: Dolly Montoya Castaño, Ph. D.
Vicerrector sede Bogotá: José Ismael Peña Reyes, Ph. D.
Decana Facultad de Ciencias: Martha Raquel Fontanilla Duque, Ph. D.
Director Departamento de Farmacia: Jesús Becerra Camargo, Ph. D.
Directora Área Curricular de Farmacia: Bibiana Margarita Rosa Vallejo Díaz, 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, Israel Institute of Technology (Technion), Haifa, Israel.
Carlos Bregni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Juan M. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.
Juan R. Perilla, Ph. D., Department of Chemistry and Biochemistry, College of Arts and Sciences, University of Delaware, Newark, 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.
Víctor Romanowski, Ph. D., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
William E. Acree, Jr., Ph. D., Department of Chemistry, University of North Texas, Denton, Texas, U.S.A.

Comité Editorial:
Abolghasem Jouyban, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Álvaro F. Jiménez-Kairuz, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
Daniel R. Delgado, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Diego A. Chiappetta, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Fernão Castro Braga, Ph. D., Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
María A. Peña, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.
Marta Concheiro, Ph. D., National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
Paulo R. de Oliveira, Ph. D., Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, Brasil.

Evaluadores:
Arnulfo Rojas-Pérez, Ph. D., Departamento de Química, Universidad de Puerto Rico, Humacao, Puerto Rico.
Aydi Abdelkarim, Ph. D., Laboratory Materials, Molecules and Applications, Preparatory Institute for Scientific and Technical Studies, Marsa, Tunisia.
Beatriz Torres, M. Sc., Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.
Carlos A. Calderón-Ospina, Ph. D., Unidad de Farmacología, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Claudia P. Ortiz, M. Sc., Corporación Universitaria Minuto de Dios - UNIMINUTO, Neiva, Huila, Colombia.
Daniel R. Delgado, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Daniela Toro, Esp., Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.
Darío A. Tinjacá, Ph. D., Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque, 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, M. Sc., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Edgar F. Vargas, Ph. D., Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá D. C., Colombia.
Eduardo Lagomarsino, Ph. D., Cátedra de Farmacia Clínica, 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.
Giannina Gatti, Esp., Grupo OSDE, Buenos Aires, Argentina.
Irmis P. Osorio, M. Sc., Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
José J. López, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Luis F. Ospina, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Mahmut Erzengin, Ph. D., Department of Chemistry, Aksaray University, Turkey.
María A. Peña, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.
María d. M. Muñoz, M. Sc., E.S.E. Hospital Pío XII, Colón, Putumayo, Colombia.
Nerlis Pájaro, Ph. D., Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas,
Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.
Olga E. García, Ph. D. (C), Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.
Paulo R. Barros-Gomes, M. Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Abaetetuba, Brasil.
Reinaldo G. Sotomayor, M. Sc., Programa de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico, Colombia.
Ximena Zarate, Ph. D., Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma De Chile, Santiago, Chile.

Asistente editorial: Anyeli A. Rivera, B. A.
Edición, armada electrónica e impresión: Proceditor Ltda., Bogotá.
Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102. Correo electrónico: *proceditor@yahoo.es*

MISIÓN

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

VISIÓN

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

ÉTICA

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

LICENCIA CREATIVE COMMONS

Todo el contenido de esta revista, excepto donde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en *http://co.creativecommons.org/?page_id=13*
La totalidad de los números anteriores se encuentran disponibles en el sitio web: *http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa*

Contenido

Evaluation of particle size and zeta potential for vaccine design
Renan Marcel Bonilha Dezena, Paulo César Pires Rosa 7

Impurezas elementales en las sustancias activas: una perspectiva general
Juan Carlos Ortiz Lara, Mayra Yanelly Salvitano Domínguez,
Edgar Mendez Campos, Paola Valeria Robles Salgado 11

Quality evaluation and dissolution profile of hydrochlorothiazide tablets available in Salvador-BA, Brazil
Cinara Vasconcelos da Silva, Paula Maiana Oliveira Ferreira, Matheus da Silva Ferreira,
Amanda dos Santos Teles Cardoso, Valdinéa dos Santos Dias, Cleber Alberto Schmidt,
Aníbal de Freitas Santos Júnior, Edith Cristina Laignier Cazedey 59

Medición del consumo de antibióticos en unidades neonatales de tres instituciones de alto nivel de complejidad en Antioquia, Colombia
Laura Milena Rendón, Esteban Agudelo, Adriana Milena Echavarría,
Santiago Atehortúa 78

Caracterización química y actividad antimicrobiana de los componentes volátiles de *Eucalyptus* de dos especies de Venezuela
Silvana Villarreal-Rivas, Luis Rojas-Fermin, Rocelvic Lárez, María Torres,
Clara Díaz, María Lucena de Ustáriz, Juan Carmona 91

A simple strategy for washing a recrystallized drug from viscous and non-volatile solvents prior to XRD study: A technical note
Elaheh Rahimpour, Abolghasem Jouyban 107

Dispersiones sólidas de solubilidad mejorada fabricadas en mezcladores de alto corte: una oportunidad para la industria farmacéutica local mexicana
Abigail Garcia-Radilla, Mariana Ortiz-Reynoso, Jonnathan G. Santillán-Benítez,
Edna T. Alcantara-Fierro 114

Análisis transversal de especies vegetales del sureste de México, en su uso para enfermedades cardiovasculares
Fimy Cristhel Narez Mendoza, Oswaldo Hernández Abreu 155

Uso de medicamentos y estilo de vida de estudiantes universitarios colombianos durante el confinamiento en tiempos de pandemia por COVID-19
Jaime Andrés González-Vega, Linda Lucía Guardo-Martínez,
Cristhian Ibañez-Bersinger, Nerlis Pájaro-Castro, Alfonso Palmieri-Luna 188

Mucuna pruriens (Velvet bean) seed extract ameliorates epilepsy and anxiety against in vivo experimental models: A histopathological analysis
Shanti Bhushan Mishra, Divya Rani Sharma, Shradhanjali Singh 228

Modulation of IL-6 in ameliorating arthritic conditions in rats by *Rosa alba* L flower extract and fraction
Man Singh, Danish Ahmed, Himanshu Pandey, Rahul Deo Yadav, Shradhanjali Singh, Shanti Bhushan Mishra 250

Case report of patients with chronic non-communicable diseases in pharmacotherapeutic monitoring remotely during the COVID-19 pandemic
Amanda dos Santos Teles Cardoso, Cinara Vasconcelos da Silva, Marcelo Tavares Pereira, Max Denisson Maurício Viana 275

Sedación oral a nivel pediátrico aplicada en odontología
Guido José Jiménez Terreros, María Cristina Alvear-Córdova, María Isabel Astudillo Crespo, Edisson Mauricio Pacheco-Quito 287

Molecular insights into the binding mechanisms of human and mouse Glutamate-cysteine ligases
Ige Olaoye2, Babatunde Oso, Adepeju Aberuagba 311

A segurança da farmacoterapia em pacientes oncológicos pediátricos: uma revisão de literatura
Alison Lucas Barboza, Anna Paula de Castro Teixeira, Camila de Albuquerque Montenegro, Maria Emília da Silva Menezes, Fernando de Sousa Oliveira 337

Cronofarmacología de los psicofármacos: Revisión de tema
Paula Sofía Moreno Castro, Paula Alejandra Sánchez Correa, Álvaro Vallejos Narváez 356

Efeitos sobre funções cognitivas, analgésicos e ansiolíticos de medicamentos homeopáticos e da 7-epiclusianona em um modelo experimental de camundongos *Swiss*
Luis F. C. dos Reis, Alexsander G. R. Ribeiro, Flávia S. I. França, Cláudio Daniel Cerdeira, Marcelo H. dos Santos, Marcos J. Marques, Aline P. Castro 381

Determinação da atividade antimicrobiana e toxicológica das folhas de *Annona muricata* Linn (graviola)
Jamicelly Rayanna Gomes da Silva, Elayne Rayane Diniz Melo, Aurea Juliene Oliveira, Juliana Gonçalves Silva, Iran Alves da Silva, Elder Pedro Nunes de Araujo, Larissa Morgana Bezerra da Silva, Risonildo Pereira Cordeiro 407

Potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória e antifúngica da *Anacardium occidentale* (Linn): Revisão de literatura
Antônio Rony da Silva Pereira Rodrigues 421

Potencial farmacológico da canela-de-velho (*Miconia albicans*): Uma revisão integrativa
Thays Milena Silva Lopes, Gustavo Fernandes Queiroga Moraes, Ana Laura de Cabral Sobreira, Julia Beatriz Pereira de Souza 435

Production of a phenolic-rich extract of aroeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities
William Gustavo Lima, Felipe Rocha da Silva Santos, Vinícius Oliveira de Faria, Nayara Alves de Souza, Luiz Pedro de Souza-Costa, Débora Cristina Sampaio de Assis, Waleska Stephanie da Cruz Nizer, Jaqueline Maria Siqueira Ferreira, Magna Cristina de Paiva, Júlio César Moreira Brito 471

Atividade anti-*Staphylococcus aureus* e anti-*Klebsiella pneumoniae* do cinamaldeído e suas interações com ATP sintase e FtsZ através do docking molecular
Emerson Luan Andrade de Oliveira, Gislaine da Silva Rodrigues, Abrahão Alves de Oliveira Filho, Cássio Ilan Soares Medeiros 499

Descripción teórica de la detección electroquímica del fármaco pilocarpina, asistida por el compuesto de colorante escuárico con el oxihidróxido de vanadio (III)
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Yana G. Ivanushko, Tetiana B. Sykyrytska, Igor G. Biryuk, Olga V. Luganska, Vira V. Kopiika, Valerii I. Domnich, Petro I. Yagodynets´, Zholt O. Kormosh, Tetiana V. Morozova, José I. F. Martins, Lucinda Vaz dos Reis 514

A descrição matemática da detecção eletroanalítica da metaqualona, baseada na sua eletrooxidação sobre o compósito da poli(5-amino-1,4-naftoquinona) com o oxihidróxido de cobalto
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Adriano O. da Silva, Yana G. Ivanushko, Bohdana Yu Banul, Tetiana V. Honchar, Petro I. Yagodynets´, Olga V. Luganska, Zholt O. Kormosh, José I. F. Martins, Vira M. Odyntsova, Mykola P. Krasko, Necdet Karakoyun 528

Reacciones adversas de hidroxicloroquina en pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 hospitalizados en una institución de alta complejidad de Bogotá, Colombia
Natalia Guzmán Zea, Diana María Chavarro Rodríguez, Agustín Daniel Pava Pérez, María Alejandra González Rosario, Diana Catalina Zapata-Cristancho 540

Potencial antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida tropicalis*
Maelle Santos Araújo, Maria Alice Araújo de Medeiros, Millena de Souza Alves, Bernadete Santos, Aleson Pereira de Sousa, Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira, Edeltrudes de Oliveira Lima, Gabriela Lemos de Azevedo Maia, Abrahão Alves de Oliveira Filho 555

Resúmenes de los trabajos presentados en FarmaCosmética 2023,
realizado en Bogotá D. C., Colombia, durante Marzo 8-10, 2023 564

Letter to Editor / *http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.xxxxxx*

Evaluation of particle size and zeta potential for vaccine design

Renan Marcel Bonilha Dezena,[1]* Paulo César Pires Rosa [2]

[1] Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology (Post Graduation), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

[2] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: renan_marcel@hotmail.com

Received: September 16, 2022

Corrected: October 23, 2022

Accepted: October 28, 2022

Nanotechnology is a field of science that focuses on understanding and obtaining materials at the nanometer scale, which is directly related to atoms and molecules. The application potential of nanoparticles is extremely broad and diverse [1, 2].

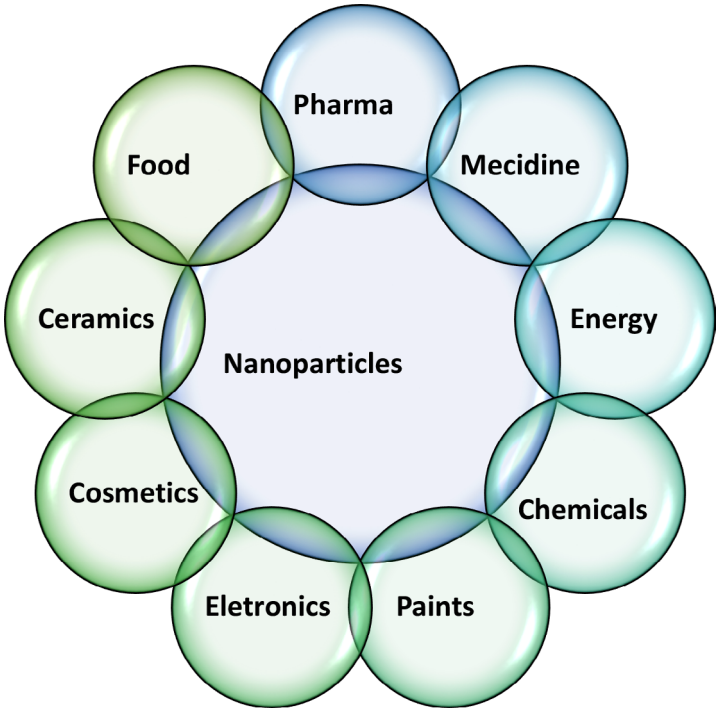


Figure 1. Potential application fields.

Instrumental analytical chemistry has become an important ally in the characterization of nanoparticles, mainly through the use of dynamic light scattering (DLS) and zeta potential techniques, enabling learning about the properties of individual particles such as: stability of suspensions, sedimentation, viscosity, reactivity, density, porosity and mainly particle size distribution [3].

The DLS technique is capable of detecting small variations in intensity referring to the scattering of light depending on the type of equipment at an angle normally of 90° due to the phenomena of Brownian motion, diffusion from the analyzed samples such as in formulations containing particles suspended in a vehicle liquid or droplets composed of lipids [3].

The zeta potential is determined as a result of the net electrical charge at the interface between the solid surface (particles) and the solvent [3]. From the medical point of view, the human body in relation to its smallest subunit, it is possible to verify that cells, molecules and even microorganisms comprise the nanoscale range, as shown in table 1.

Table 1. Materials and nanoscale [4-7].

Material	Nanometers (nm)
Human Cells (Average)	10.000 – 30.000
Bacteria (Typically)	2000 – 3000
Virus (Few exceptions)	15 – 300
Water (van der Waals Diameter)	0.275

The vaccine pharmaceutical product is contemplated on the nanometer scale and currently there are several technologies for its manufacture such as inactive viruses or bacteria, live attenuated viruses, mRNA, fragments, viral vector. In terms of formulation, they can be produced using adjuvants as excipients, which have a direct impact on the effectiveness and duration of the immune response, with aluminum salt being the most used. As demonstrated in the literature, the particle size has significant relevance with regard to the activation of the immune system [7, 8].

After the administration of the vaccine, the viruses, particles in nanometric scale (15-300 nm) are captured by the dendritic cells that have the ability to activate an immune response through antibodies and killer cells. However, formulations using aluminum salt as an excipient with particles on the micrometric scale act in a different immunological pathway, which is mediated by antibodies, preferably by monocytes [7, 8].

The analytical technique (DLS) and zeta potential are techniques that provide agility and assertiveness for the characterization of the size distribution profile of nanoparti-

cles with applications both in research and development, making it possible to determine the immunogenicity pathway and quality control of vaccines with a focus on stability/shelf-life [7, 8].

Therefore, from the industrial point of view of quality control, regulatory and design of new vaccine formulations, analytical chemistry plays a fundamental role.

Disclosure statement

All authors report that they do not have any conflicts of interest.

References

1. T. Taha, A. Barzinjy, F. Hussain, T. Nurtayeva, Nanotechnology and computer science: Trends and advances, *Memories - Materials, Devices, Circuits and Systems,* **2,** 100011 (2022). DOI: https://doi.org/10.1016/j.memori.2022.100011

2. C. Fajardo, G. Martinez-Rodriguez, J. Blasco, J. Mancera, B. Thomas, M. De Donato, Nanotechnology in aquaculture: Applications, perspectives and regulatory challenges, *Aquaculture and Fisheries,* **7**(2), 185-200 (2022). DOI: https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.12.006

3. R. Xu, Light scattering: A review of particle characterization applications, *Particuology*, **18,** 11-21 (2015). DOI: https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.05.002

4. S. O'Hern, D. Jang, S. Bose, J. Idrobo, Y. Song, T. Laoui, J. Kong, R. Karnik, Nanofiltration across defect-sealed nanoporous monolayer graphene, *Nano Letters,* **15**(5), 3254-3260 (2015). DOI: https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00456

5. J. Louten, Virus structure and classification, in: *Essential Human Virology,* 2016, pp. 19-31. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8

6. N. Etchart, Giving it its best shot: Quality control of antiviral vaccines with the Litesizer. URL: https://www.anton-paar.com/corp-en/services-support/document-finder/application-reports/giving-it-its-best-shot-quality-control-of-antiviral-vaccines-with-the-litesizer/, accessed Sep. 10, 2022.

7. E. Shardlow, M. Mold, C. Exley, From stock bottle to vaccine: Elucidating the particle size distributions of aluminum adjuvants using Dynamic Light Scattering, *Frontiers in Chemistry,* **4,** 48 (2017). DOI: https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00048

8. N. Etchart, P. Desmoulins, K. Chemin, C. Maliszewski, B. Dubois, F. Wild, D. Kaiserlian, Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8+CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein, *The Journal of Immunology,* **167**(1), 384-391 (2001). DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.384

Artículo de revisión / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102095*

Impurezas elementales en las sustancias activas: una perspectiva general

Juan Carlos Ortiz Lara*, Mayra Yanelly Salvitano Domínguez, Edgar Méndez Campos, Paola Valeria Robles Salgado

Sintenovo, S.A. de C.V. Calle 13 Este nº 3 62578 Civac, Jiutepec, Estado de Morelos, México.

*Correo electrónico: jcortiz@sintenovo.com.mx.

Recibido: 12 de abril de 2022

Revisado: 21 de julio de 2022

Aceptado: 25 de julio de 2022

Resumen

Las sustancias activas deben cumplir con altos requerimientos de calidad, para lograr este objetivo se debe cumplir con varios parámetros tales como un limitado contenido de impurezas. En esta tesitura se pueden mencionar diferentes tipos de impurezas tales como orgánicas, inorgánicas, mutagénicas, disolventes residuales e impurezas elementales. La importancia de las impurezas es alta, principalmente porque son tóxicas y pueden provocar efectos adversos en los pacientes por lo tanto se deben limitar. Específicamente las impurezas elementales son residuos de elementos metálicos que pueden provenir de varias operaciones en el proceso de fabricación de una sustancia activa. Estos contaminantes se clasifican en la guía ICHQ3D en 4 grupos en función de su toxicidad y su presencia en una sustancia activa se explica por los procesos de síntesis (materias primas, disolventes, agua) o por desgaste de los equipos productivos (reactores, centrifugas, secadores, molinos). Para poder determinar las cantidades de estos compuestos los métodos analíticos son parte fundamental ya que deben ser lo suficientemente sensibles y específicos. Aunado a la parte analítica, la evaluación mediante un análisis de riesgo proporciona la información teórica de las potenciales impurezas metálicas presentes en una sustancia activa. Un caso de estudio ejemplifica este apartado. Otro aspecto de suma importancia es el control de la presencia de las impurezas metálicas en los procesos sintéticos, por lo que tener una visión general de los métodos de control es de capital importancia con objeto establecer la estrategia adecuada, este apartado se ejemplifica con un caso reportado en la literatura. Las tendencias generales de purificación de una sustancia activa proporcionan una perspectiva de los avances en este tema. En esta revisión se incluye una breve revisión de los tópicos previamente mencionados.

Palabras clave: Principios activos, impurezas metálicas, seguridad, análisis de riesgo, métodos de control.

Summary

Elemental impurities in Active Substances: a general perspective

The elemental impurities must meet high quality requirements, in order to achieve this goal several analytical parameters such as a low impurity content is the capital importance. In this situation, several types of impurities can be mentioned for example: organic and inorganic impurities, mutagenic compounds, residual solvents, and elemental impurities. The relevance of the impurities is high because these compounds are toxic for the patient and can cause adverse effects in patients therefore they should be limited. Specifically the elemental impurities are residues of metal elements that come from the unit operations used in the manufacturing process of an active substance. These contaminant are classified in the ICHQ3D guide in four groups according to their toxicity and their presence in an active substance is explained by the synthesis process (raw materials, solvents, water) or by the wear of the productive equipment (reactors, centrifuges, dryers, mills). In order to determine the quantities of these compounds analytical methods are a fundamental part, since they must be sufficiently sensitive and specific. The evaluation through a risk analysis provides the theoretical information of the potential metallic impurities present in an active substance; a case study exemplifies this section. Another important aspect to take in account is the control of the presence of metal impurities in synthetic processes, so having an overview of the control methods is a paramount importance in order to establish the appropriate control strategy. In this section, a reported case is described. Finally, general trends in purification of an active substance provide an insight into developments in this area. This paper includes a brief review of the previously mentioned topics.

Keywords: Pharmaceutical ingredients, elemental impurities, safety, risk analysis, control methods.

Resumo

Impurezas elementares em Substâncias Ativas: uma perspectiva geral

As impurezas elementares devem atender a requisitos de alta qualidade, para atingir esse objetivo, vários parâmetros analíticos, como um baixo teor de impurezas, são de capital importância. Nesta situação, vários tipos de impurezas podem ser mencionados, por exemplo: impurezas orgânicas e inorgânicas, compostos mutagênicos, solventes residuais e impurezas elementares. A relevância das impurezas é alta porque esses compostos são tóxicos para o paciente e podem causar efeitos adversos nos pacientes, portanto, devem ser limitados. Especificamente as impurezas elementares são resíduos de elementos metálicos provenientes das operações unitárias utilizadas no processo de fabricação de uma substância ativa. Esses contaminantes são classificados no guia ICHQ3D em quatro grupos de acordo com sua toxicidade e sua presença em uma substância ativa é explicada pelo processo de síntese (matérias-primas, solventes, água) ou pelo desgaste dos equipamentos produtivos (reatores, centrífugas, secadores, moinhos). Para determinar as quantidades desses compostos os métodos analíticos são parte fundamental, pois devem ser suficientemente sensíveis e específicos. A avaliação por meio de uma análise de risco fornece a informação teórica das potenciais impurezas metálicas presentes em uma substância ativa; um estudo de caso exemplifica esta seção. Outro aspecto importante a ter em conta é o controlo da presença de impurezas metálicas nos processos sintéticos, pelo que ter uma visão geral dos métodos de controlo é de suma importância para estabelecer a estratégia de controlo adequada. Nesta seção, um caso relatado é descrito. Finalmente, as tendências gerais na purificação de uma substância ativa fornecem uma visão sobre os desenvolvimentos nesta área. Este artigo inclui uma breve revisão dos tópicos mencionados anteriormente.

Palavras-chave: Insumos farmacêuticos, impurezas elementares, segurança, análise de risco, métodos de controle.

Introducción

La regulación de la fabricación de las sustancias activas cada vez es más restrictiva, este hecho ha tenido impacto en la fabricación de medicamentos haciendo que estos cada día sean más seguros para los pacientes. El nivel alcanzado en la regulación no sucedió de la noche a la mañana, más bien fue una evolución paulatina permitiendo que hoy en día se puedan ofrecer medicamentos seguros para la población [1]. No

obstante, a pesar de los estrictos controles, incluso en nuestros días los fármacos se pueden contaminar con impurezas de diversa índole. Tal es el reciente caso de contaminación de algunos Sartanos [2] y Ranitidina [3] con N-nitrosaminas, este hecho desencadenó la dirección de los esfuerzos de las agencias regulatorias al control de estos compuestos cancerígenos. En esta temática, la fabricación de fármacos está regulada en México por la norma NOM-164-SSA (Buenas prácticas de fabricación de fármacos) [4] y a nivel internacional por la ICHQ7 (*Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients*) [5]. Uno de los aspectos esenciales en la fabricación de sustancias activas es el control de los procesos y en consecuencia control de los subproductos generados. Para lograr que las sustancias activas sean seguras, las agencias regulatorias establecieron guías adicionales que controlan y limitan el contenido de impurezas en las sustancias activas, principalmente porque estos compuestos no tienen un efecto terapéutico. Hay diferentes tipos de impurezas que se deben controlar, por ejemplo las impurezas orgánicas y de degradación que se regulan por la ICHQ3A [6], este tipo de impurezas son las que se generan durante el proceso de fabricación. En general se pueden clasificar en: materiales de inicio, intermediarios remanentes, biscompuestos, productos de sobrerreacción, interacción, impurezas quirales, tautoméricas, entre otras [7]. Otras sustancias consideradas contaminantes son los disolventes residuales los cuales también son considerados impurezas ya que tampoco aportan ningún efecto terapéutico. Los disolventes orgánicos están clasificados en función de su toxicidad y son controlados por la guía ICHQ3C (*Guideline for residual solvents*) [8]. Esta guía divide a los disolventes en 4 clases en función de su toxicidad siendo la clase 3 la más apta para utilizarse en la fabricación de sustancias activas. Algunos ejemplos pertenecientes a esta clase son: la acetona, acetato de etilo, heptano, terbutilmetiléter, dimetilsulfóxido, etc. Por su parte la guía ICHM7 [9] clasifica y regula a las impurezas genotóxicas las cuales son impurezas que pueden dañar a nivel de ADN. En este contexto varias estructuras han sido clasificadas como potencialmente genotóxicas, dentro de estos grupos se pueden mencionar: N-hidroxiarilos, aminoarilos N-acetilados, óxidos de N-azarilo, aminoarilos, aldehídos, N-nitrosaminas, nitrocompuestos, carbamatos, époxidos, aziridines, hidracinas, aceptores de Michael, haloalquenos, etc. [10]. Como es de dominio público, los fármacos son las materias primas para preparar los medicamentos por lo tanto, también se deben mencionar las guías que se encargan de controlar y reglamentar el contenido de las impurezas en las formas farmacéuticas ya que es el destino final de los principios activos. Las impurezas en una forma farmacéutica se pueden clasificar en impurezas provenientes de la fabricación de la sustancia activa, producto de degradación, impurezas provenientes de la formulación, interacción con los excipientes, polimórficas e incluso por interacción con el material de empaque o con agua residual [11] y están reguladas a nivel nacional por la norma NOM-059-SSA (Buenas prácticas de fabri-

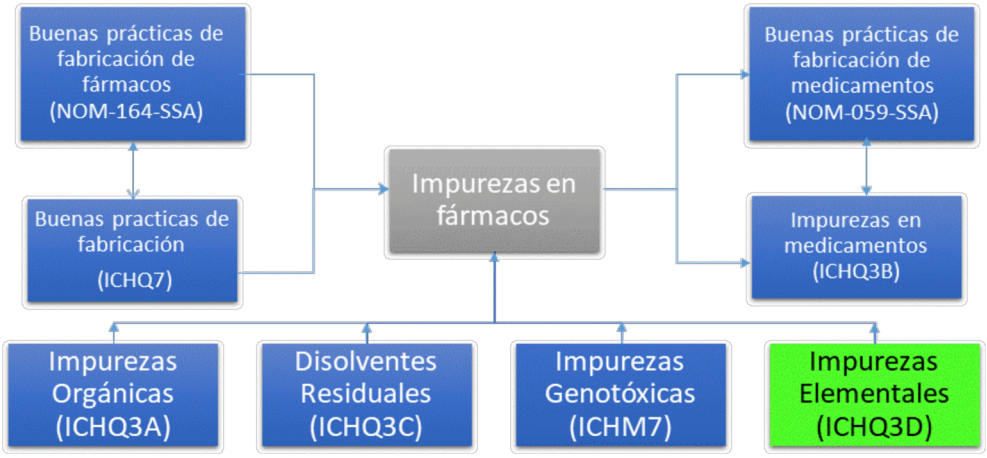


Figura 1. Guías ICH y SSA para el control de las impurezas en sustancias activas y medicamentos

cación de medicamentos) [12] y a nivel internacional por la ICHQ3B (*Impurities in new drug products*) [13]. Los argumentos antes descritos evidencian la complejidad de los factores que se deben controlar con el objetivo de mantener un ingrediente activo suficientemente puro, que sea viable para la fabricación de medicamentos. En la figura 1 se muestran las guías asociadas al control de impurezas en las sustancias activas y formas farmacéuticas.

Habiendo expuesto los tipos de impurezas que pueden estar presentes en un fármaco, se observa que el control sobre el contenido de las mismas en una sustancia activa es de capital importancia para poder brindar el efecto terapéutico deseado. En este contexto la ICHQ3A define a una impureza como cualquier componente en la sustancia activa que no sea propiamente la sustancia activa o los excipientes. Por lo tanto, cualquier otro compuesto presente en la sustancia activa debe ser considerado como una impureza. En esta guía también se clasifica a las impurezas en orgánicas, disolventes e impurezas inorgánicas. Se enfatizan las impurezas metálicas (inorgánicas) las cuales pueden provenir de reactivos, ligandos, catalizadores, sales inorgánicas, ayuda filtros, carbón o por erosión de los equipos de fabricación (Figura 2).

Los metales residuales que se pueden encontrar en las sustancias activas se conocen como impurezas elementales, impurezas metálicas o incluso metales pesados [14]. Las mismas en los últimos años han cobrado gran importancia principalmente debido a que algunas son altamente tóxicas y por lo tanto se deben controlar. En esta revisión se describirá de manera sucinta y desde un punto de vista general la importancia que tiene el control de las impurezas metálicas en las sustancias activas.

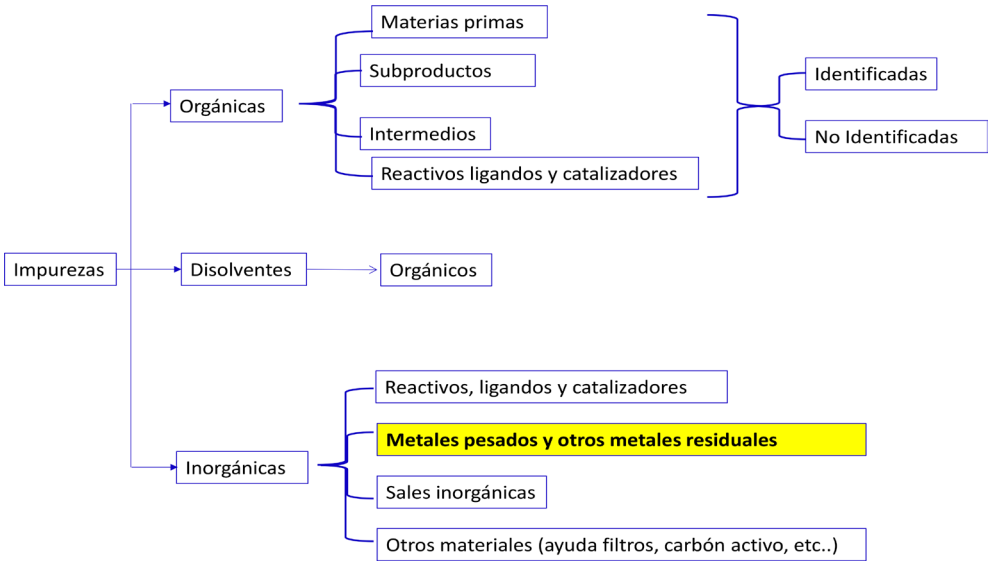


Figura 2. Clasificación de las impurezas en Sustancias activas según la ICHQ3A

Impurezas elementales y su impacto en la síntesis de sustancias activas

Las impurezas elementales es un tópico que recientemente ha cobrado una gran importancia en la fabricación de sustancias activas, ya que los límites en el producto final o ingrediente activo deben cumplir con los lineamientos establecidos. Por lo tanto, es importante tener una clara idea acerca de las siguientes preguntas:

¿Cuál es la clasificación de las impurezas y los límites que pueden estar presentes en el fármaco?

¿Cómo puede contaminarse una sustancia activa con impurezas elementales?

¿Cómo se pueden controlar las impurezas elementales?

¿Cuál es la metodología de análisis adecuada para la identificación de este tipo de impurezas?

Para contestar estas preguntas será necesario describir tópicos como equipos de fabricación, métodos analíticos, guía ICH, etc. La relación entre estos temas se puede ver en la figura 3. Estos temas se desarrollaran en los apartados posteriores.

ICHQ3D (Clasificación y límites)

La guía ICHQ3D se actualizó recientemente en 2019 [15], en este documento se establecen los criterios para controlar las impurezas elementales en las sustancias activas y

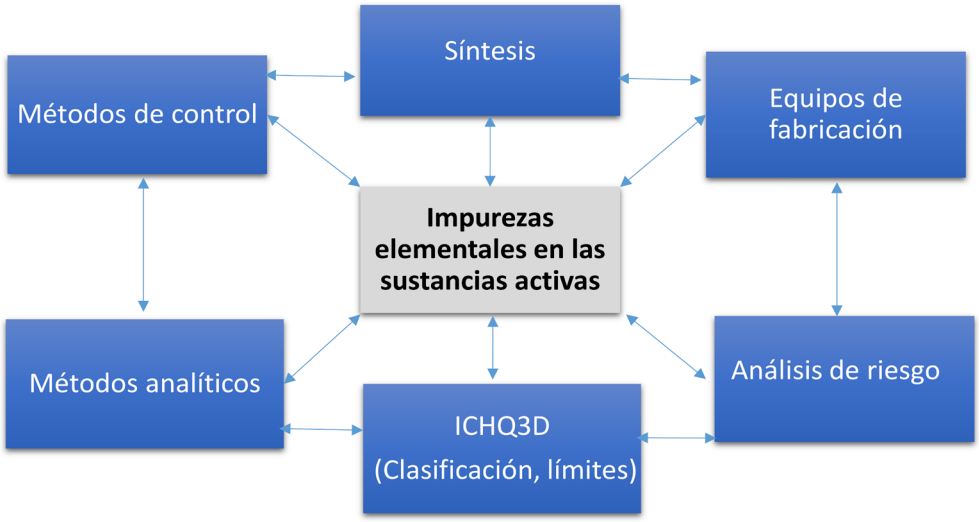


Figura 3. Tópicos impactados por la presencia de impurezas elementales en las sustancias activas

las formas farmacéuticas. Dentro de estos criterios se mencionan: los límites de aceptación en función de las vías de administración, así como la clasificación en función de su toxicidad. También se comentan las principales fuentes de aportación de impurezas metálicas (catalizadores, reactivos, equipos productivos, entre otros) y se propone la evaluación del contenido y la decisión de ejecución del análisis de las impurezas elementales con base en un análisis de riesgo. En los siguientes párrafos se describirán sucintamente estos temas iniciando por la clasificación.

Clasificación de las impurezas metálicas

La guía ICHQ3D, agrupa a las impurezas elementales en tres clases en función de su toxicidad y su abundancia natural.

Clase 1

La clase 1 incluye los siguientes elementos Arsénico, Cadmio, Mercurio y Plomo (As, Cd, Hg y Pb) que son elementos tóxicos los cuales se deben limitar y no se deben usar en la fabricación de Sustancias activas o formas farmacéuticas. La presencia de este grupo de metales principalmente se debe a que fueron aportados por algún componente (por ejemplo el uso de los equipos de fabricación y otros materiales como ayuda filtros, etc.). Debido a la toxicidad inherente que presentan se necesita incluirlos en el análisis de riesgos tomando en cuenta parámetros como las fuentes de contaminación y las rutas de administración. Esta clase de impurezas elementales se deben analizar sistemáticamente.

Clase 2.

Los elementos incluidos en esta clase son considerados compuestos tóxicos dependiendo de la ruta de síntesis. A su vez existe una subdivisión (clase 2 A y 2 B) que los agrupa según la probabilidad de ocurrencia en la sustancia activa.

Clase 2A

Los elementos de esta clase tienen una probabilidad relativamente alta de ser encontrados en la sustancia activa y se necesita un análisis de riesgo que incluya todas las potenciales vías de contaminación y administración. Los elementos pertenecientes a este subgrupo son: Cobalto, Níquel y Vanadio (Co, Ni y V). Este grupo de impurezas se debe analizar sistemáticamente.

Clase 2B

La clase 2B incluye elementos con baja probabilidad de ser encontrados en la sustancia activa, debido a su poca abundancia y baja probabilidad de ser aislados con otros materiales. Por tal motivo, estos elementos se deberán excluir del análisis de riesgo a menos que sean agregados intencionalmente durante la fabricación de la sustancia activa (por ejemplo un catalizador) o que se encuentren como excipientes u otros componentes. Los elementos de esta clase son: Plata, Oro, Iridio, Osmio, Paladio, Platino, Rodio, Rutenio, Selenio y Talio (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se y Tl). Dentro de este grupo se destaca el Paladio, Rodio y Rutenio que son los metales que más proliferan en la síntesis de sustancias activas.

Clase 3

Los elementos de esta clase presentan toxicidades bajas por vía oral, es decir alta dosis diaria permitida (PDE), generalmente > 500 μg/día, pero requieren evaluación si la ruta de administración es por vía inhalada y parenteral. Para la vía de administración oral, no se requiere incluirlos a menos que se hayan adicionado intencionalmente durante la fabricación. En cuanto a las vías de administración parenteral e inhalada, la inclusión de estas impurezas elementales se debe evaluar solo si la dosis diaria permitida es superior a 500 μg/día. Los elementos de esta clase son: Bario, Cromo, Cobre, Litio, Molibdeno, Estroncio y Estaño (Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb y Sn). Se destaca en este grupo el Litio que *persé* es un ingrediente farmacéutico y también se utiliza con bastante frecuencia en la hidrólisis de esteres y formación de sales. Así mismo el Cromo y el Molibdeno son utilizados para fabricar equipos de acero inoxidable. En la Figura siguiente se muestra una guía rápida de las impurezas elementales que se deben cuantificar. En resumen las clases 1 y 2A se deben cuantificar invariablemente mientras que las clases 2B y 3 se deben cuantificar solo si se agregan intencionalmente al proceso.

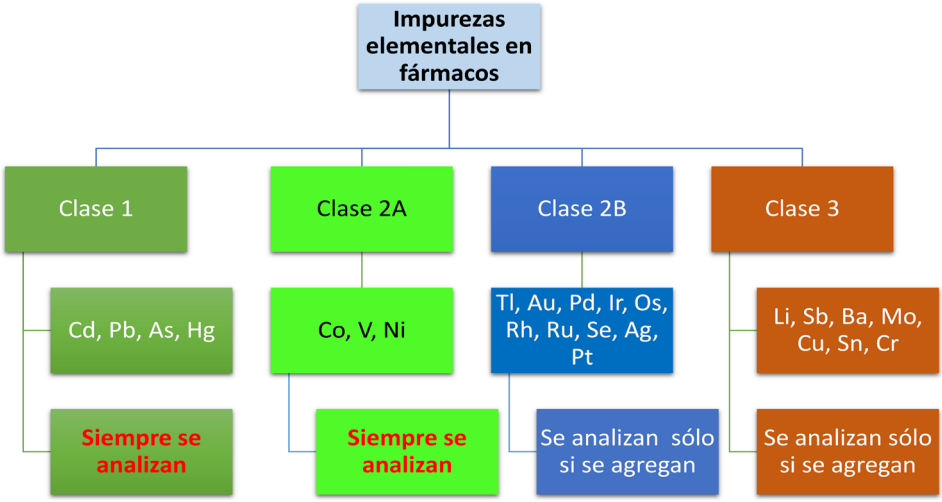


Figura 4. Clasificación de las impurezas elementales según la ICH3D

Otros elementos

Existen otras impurezas elementales para las cuales los PDE no han sido establecidos debido a su inherente baja toxicidad y diferencias en cuanto a la regulación de distintas regiones. Si estas impurezas se encuentran presentes o se incluyeron en la fabricación de las formas farmacéuticas se deben aplicar las regulaciones locales para cada elemento. Por ejemplo el Manganeso (Mn) y el Zinc (Zn) pueden impactar pacientes con función hepática comprometida. Por otra parte, la presencia de Wolframio (W) en proteínas terapéuticas puede tener consideraciones de calidad. Algunos de los elementos incluidos son: Aluminio, Boro, Calcio, Hierro, Potasio, Magnesio, Manganeso, Sodio, Wolframio y Zinc (Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W y Zn). Cabe destacar que algunas de estas impurezas metálicas pueden ser contraiones en sales farmacéuticas (Por ejemplo: Ca, Mg, Na, K, etc.).

En la Tabla 1 se describe la clasificación de las impurezas elementales y los límites para cada vía de administración. Se remarca el hecho que adicionar dicha impureza elemental (incluida en un reactivo) durante la fabricación de la sustancia activa hace que se deba analizar dicho elemento. Por ejemplo, si se usa un catalizador que contenga Rutenio en su estructura, se deberá analizar Rutenio en la sustancia activa. Adicionalmente, como ya se mencionó previamente, los elementos de la clase 1 y clase 2A se deben analizar sistemáticamente.

Fuentes de impurezas metálicas

Como cualquier proceso químico, la síntesis de sustancias activas o precursores se utiliza una serie de materias primas, materiales auxiliares y diversas condiciones de reac-

Tabla 1. Clasificación y límites de las impurezas elementales según la ICH3D

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI se agregó intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente			Límites de concentración (µ/g)		
				Oral	Parenteral	Inhalación	Oral	Parenteral	Inhalado
1	Cadmio	Cd	SI	SI	SIz	SI	0,5	0,2	0,3
	Plomo	Pb					0,5	0,5	0,5
	Arsénico	As					1,5	1,5	0,2
	Mercurio	Hg					3	0,3	0,1
2A	Cobalto	Co	SI	SI	SI	SI	5	0,5	0,3
	Vanadio	V					10	1	0,1
	Níquel	Ni					20	2	0,5
2B	Talio	Tl	SI	NO	NO	NO	0,8	0,8	0,8
	Oro	Au					10	10	0,1
	Paladio	Pd					10	1	0,1
	Iridio	Ir					10	1	0,1
	Osmio	Os					10	1	0,1
	Rodio	Rh					10	1	0,1
	Rutenio	Ru					10	1	0,1
	Selenio	Se					15	8	13
	Plata	Ag					15	1	0,7
	Platino	Pt					10	1	0,1

(*Continúa*)

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI se agregó intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente			Límites de concentración (µ/g)		
				Oral	Parenteral	Inhalación	Oral	Parenteral	Inhalado
3	Litio	Li	SI	No	SI	SI	55	25	2.5
	Antimonio	Sb			SI		12	9	2
	Bario	Ba			NO		140	70	30
	Molibdeno	Mo			NO		300	150	1
	Cobre	Cu			SI		300	30	3
	Estaño	Sn			NO		600	60	6
	Cromo	Cr			NO		1100	110	0,3

ción para lograr su objetivo. Un factor adicional es el uso de equipos de fabricación. Todas estas variables por separado o en conjunto pueden derivar en el aporte de impurezas elementales. En general se señalan los siguientes factores como fuentes de impurezas elementales: equipos de fabricación, catalizadores metálicos, reactivos inorgánicos, materias primas orgánicas, agua, disolventes, otros aditivos de proceso y empaque primario [16]. Estos factores se compilan en la Figura 5.

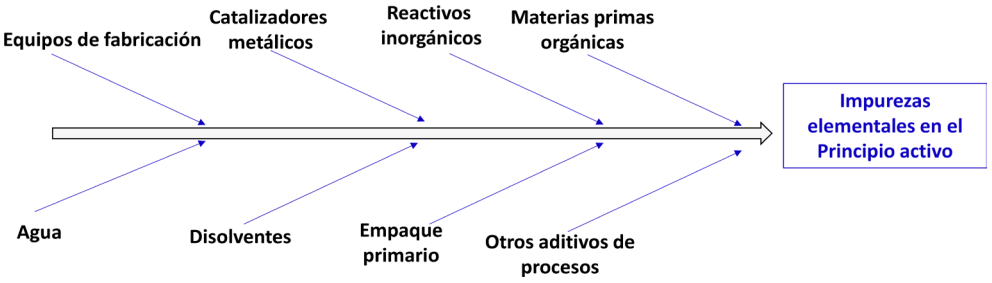


Figura 5. Parámetros que contribuyen a la presencia de impurezas elementales en las sustancias activas

Composición de los materiales de los equipos de fabricación

Los equipos de fabricación están hechos con diferentes aleaciones, las más usuales en la industria farmoquímica son: el hastelloy, el acero inoxidable, y los reactores de acero vitrificado. En general los reactores de hastelloy son resistentes a la corrosión y pueden usarse en reacciones en medios básicos o ácidos o neutros, la limitante es que son muy costosos. Los reactores de acero inoxidables son utilizados frecuentemente en la fabricación de sustancias activas y son considerablemente menos costosos que los reactores de hastelloy. La única limitante es que son sensibles a la corrosión ácida. Una alternativa es usar reactores de acero recubiertos por una capa de enamel también llamados reactores vitrificados, los cuales son utilizados para trabajar en medios ácidos. Este tipo de reactores debido a su fabricación son utilizados también para procesos de cristalización. Sus limitantes son la sensibilidad a los medios básicos y a cambios térmicos súbitos.

Los metales que pueden aportar los reactores de síntesis son variables y dependen del tipo de aleación pero principalmente se puede mencionar: **Hastelloy** aporta Ni, Cr, Mo, Co, W, V, Mn y otros metales que en general no son tóxicos (Fe, Si, Mn, P y S) [17]. En lo que concierne el **acero inoxidable,** se fabrica a partir de Ni, Cr, Mo, Mn [18]. Finalmente, para el recubrimiento de los reactores de **acero vitrificado** se construyen a partir de Si, B, Al, Zr, Mg, Na, es importante destacar que únicamente el recubrimiento de enamel está en contacto con el producto [19] Los elementos utilizados para fabricar reactores y equipos se compilan en la Tabla 2.

Tabla 2. Elementos potencialmente aportados por los equipos utilizados para la de fabricación de las sustancias activas.

Material de construcción de reactores	**Elementos presentes en la fabricación de la aleación o recubrimiento y su clasificación**							**Uso en los procesos de fabricación de sustancias activas**
Hastelloy	Níquel	Cobalto	Vanadio	Cromo	Molibdeno	Wolframio	Manganeso	Reactor universal, para uso en medios acido, básico, neutros, etc.
	2A	2A	2A	3	3	Otros		
Acero inoxidable	Níquel	Molibdeno		Cromo	Manganeso			Reactor para uso en medios, básicos, neutros.
	2A	3		3	Otros elementos			
Acero vitrificado	Silicio	Boro	Aluminio	Zirconio	Magnesio	Sodio		Equipo para uso en medio ácido, cristalizaciones, etc.
	Otros elementos							

Los elementos aportados por los equipos fabricados en Hastelloy se clasifican en la clase 2A (Níquel, Cobalto, Vanadio) y 3 (Cromo). Por otro lado el Wolframio y el Manganeso pertenecen a la clase Otros y no presentan toxicidad. Por su parte el acero inoxidable aporta Níquel que se encuentra en la clase 2A, Molibdeno, Cromo (clase 3) y Manganeso el cual no es tóxico. Por lo tanto estos elementos se deben incluir en el análisis de riesgo ya que potencialmente se podrían incorporar a las sustancias activas fabricadas con este tipo de equipos.

Debido a que los reactores de acero vitrificado no aportan impurezas elementales tóxicas, los siguientes párrafos se focalizaran en los equipos de hastelloy y acero inoxidable.

Tipos de equipos utilizados en la síntesis de sustancias activas

Los equipos utilizados en la síntesis de las sustancias activas son en general reactores, centrifugas, secadores, molinos y homogeneizadores que son fabricados en hastelloy, acero inoxidable y acero vitrificado. En la Figura 6 se observa un ciclo de síntesis de intermedio o sustancia activa estándar. ¿Pero cómo es que un equipo puede contaminar la sustancia activa? En los siguientes párrafos se mencionaran cómo en las etapas típicas de fabricación se pueden contaminar las sustancias activas o intermedios con las impurezas metálicas.

Reactores. Los reactores de fabricación pueden sufrir condiciones extremas por ejemplo, altos o bajos grados de acidez (pH 0 a 14), temperaturas altas (por ejemplo un reflujo de Dimetilformamida con punto de ebullición de aproximadamente 150 °C). Presiones extremas (aproximadamente 10 kg/ cm^2) como en un reactor a presión por ejemplo: un reactor de hidrogenación o un carbonilador. Adicionalmente, a estos factores se añaden múltiples combinaciones de estas variables las cuales pueden generar corrosión y erosión especialmente cuando se utilizan condiciones extremas de reacción. Un factor adicional es la compactación de algunos compuestos orgánicos que pueden erosionar puntualmente la superficie interna o incluso algunos disolventes demasiado agresivos que pueden tener un efecto de lixiviado del material de fabricación (ácido clorhídrico en isopropanol).

Centrífugas. El uso continuo, filtrando las suspensiones contenidas en los reactores, genera erosión de los mismos, principalmente porque reciben las mezclas de reacción que en ocasiones tienen reactivos corrosivos. La fuerza centrífuga es un factor adicional que contribuye al desgaste.

Secadores: Los secadores, en especial los rotatorios están sometidos a fricción continua con el producto y con cantidades importantes de disolvente (en la fase de inicio del secado). Las características intrínsecas del producto y del disolvente a secar juegan

un papel fundamental en la presencia de impurezas elementales. Ya que algunos intermedios o sustancias activas tienen diferentes durezas lo que resulta en mayor o menor fricción metal-sustancia orgánica.

Molinos. Los molinos tienen contacto directo con las sustancias activas en condiciones de fricción extrema ya que deben cizallar el principio activo directamente, la fricción entre metal y principio activo puede generar erosión de las cuchillas. El metal generado podría aportar impurezas metálicas a la sustancia activa.

En la figura 5 se representan los equipos usados en un proceso de fabricación de una sustancia activa y su potencial impacto en el contenido de impurezas elementales en el fármaco.

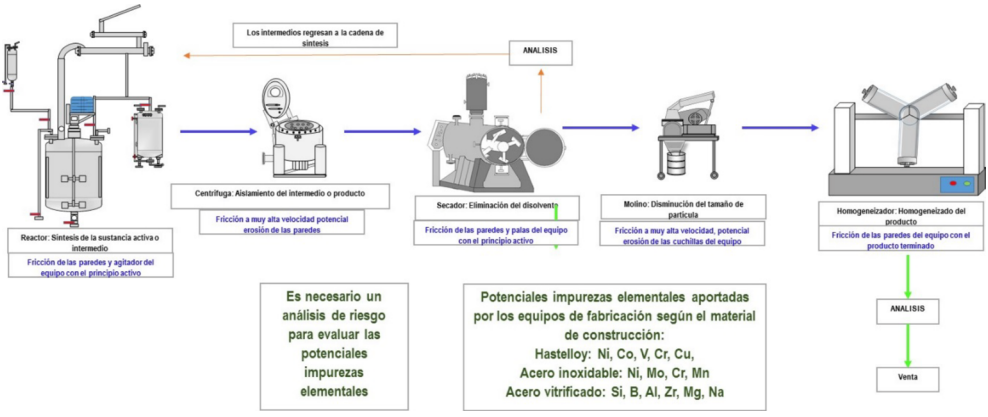


Figura 6. Contribución de los equipos de fabricación a la presencia de impurezas elementales en las sustancias activas

Catalizadores metálicos

La forma más común de introducir impurezas metálicas en las sustancias activas es mediante el uso de catalizadores. Este tipo de reactivos es utilizado frecuentemente en la síntesis de sustancias activas de hecho, esta es la principal fuente de impurezas metálicas en el producto. Los catalizadores pueden participar en una catálisis homogénea o heterogénea. En el caso de la catálisis homogénea todos los componentes de la reacción se encuentran en disolución por lo tanto una vez terminada la transformación química se necesita utilizar un método que permita eliminar el catalizador del medio de reacción. Por otro lado, en la catálisis heterogénea el catalizador se encuentra soportado en un medio insoluble durante la reacción, con lo cual una vez terminada la reacción el catalizador se elimina fácilmente mediante filtración. El ejemplo clásico es una hidrogenación con Paladio sobre carbón.

Reactivos inorgánicos / aditivos de proceso

Durante la evaluación de los factores que contribuyen a la presencia de impurezas metálicas en las sustancias activas se deben incluir los ayuda filtro (tierras diatomeas, silica gel, carbón activado y algunas sales inorgánicas tales como Cloruro de Sodio, Sulfato de Magnesio / Sodio y que pueden ser utilizados en una cantidad importante. Aunque la potencial contribución con impurezas metálicas es mínima siempre se debe hacer la evaluación y determinar el posible alcance sobre todo cuando se trabaja con cantidades estequiometrias-industriales de los reactivos. Otro aditivo de proceso muy utilizado en la síntesis de sustancias activas es el carbón activado, este tipo de aditivo como se comentara en una sección posterior ya que se puede utilizar para remover impurezas elementales del medio de reacción.

Materias primas orgánicas

Muchas de las síntesis de sustancias activas inician con fragmentos avanzados de la molécula final. La creciente demanda de intermedios cada vez más funcionalizados ha hecho que las síntesis exploren nuevas metodologías. En este contexto la utilización de catalizadores a base de metales se ha colocado en una posición privilegiada ya que ha demostrado ser una herramienta muy útil para la preparación de sustancias activas. En resumen estos argumentos indican, que cuando se deba evaluar la información disponible, se necesita incluir las rutas sintéticas de cada molécula orgánica que participa en la síntesis de la sustancia activa esto con objeto de detectar si se ha utilizado algún tipo de catalizador que pueda aportar impurezas elementales.

Agua

El agua que se utiliza en la fabricación de sustancias activas e intermedios debe cumplir con la reglamentación establecida por la Farmacopea.[20] [21] Este hecho implica que el agua debe estar libre de impurezas elementales. Por lo tanto, mientras el agua cumpla con la reglamentación vigente no aportara impurezas elementales a la sustancia activa.

Disolventes

Los disolventes utilizados en la síntesis de sustancias activas están regulados básicamente por la ICHQ3C. No obstante se deben evaluar los métodos de fabricación. Por ejemplo, para un disolvente obtenido mediante síntesis en la cual se utilizó un catalizador, es necesario evaluar el método de purificación. Es decir, se debe saber si el disolvente se aisló por destilación o cualquier otra metodología, ya que podría ser una potencial fuente de contaminación. Por lo tanto, se necesita incluir la evaluación de los disolventes en el análisis de riesgo. Esta tarea en ocasiones no es fácil de llevar acabo ya

que cada productor protege su propiedad intelectual y obtener información muchas veces es muy complicado.

Empaque primario

Los materiales de empaque también deben ser evaluados ya que pueden ser una potencial fuente de impurezas metálicas. En la fabricación de los mismos se usan materias primas con diversas funciones pero en general se pueden mencionar: colorantes que pueden contener algunas impurezas metálicas (Ti, Cr, Co, Cd, Pb, Zn, Fe, Al, Cu), antioxidantes y estabilizadores que a su vez pueden incluir Cd, Pb, y Zn, también se pueden usar otros aditivos que en general pueden contener diversos elementos como Hg, Li, Pb, Cd, Zn, Sb y Al. En esta rúbrica Jenkel y colaboradores [22, 23] recientemente publicaron una revisión acerca del impacto que los materiales de empaque pueden proporcionar a una sustancia activa mediante lixiviado. El objetivo de este trabajo fue compilar la información disponible acerca del material de empaque, así mismo en esta revisión se tomaron en cuenta los datos reportados en la literatura para algunos materiales de empaque. Se siguieron tres aproximaciones. En la primera, las muestras a analizar se generaron haciendo digestiones de los materiales de empaque y posteriormente analizando la solución con impurezas mediante ICP-MS. La segunda aproximación fue la revisión de componentes aislados de los sistemas de empaque e igualmente haciendo extracciones con disolvente para simular el uso clínico las disoluciones obtenidas se analizaron para determinar las impurezas elementales. En la tercera aproximación se determinó en la cantidad de impurezas elementales que son lixiviadas con respecto a la cantidad que posee el empaque. Ejemplos de los materiales revisados son: polietileno, cloruro de polivinilo, polipropileno, tereftalato de polietileno, acetato de vinilo etileno, polimetilmetacrilato, poliestireno, vidrio, viales de vidrio, viales de borosilicato, resinas de polipropileno, goma de clorobutilo y bromobutilo, bolsas flexibles entre otros.

Las conclusiones del trabajo reportado por Jenkel y colaboradores son: a) Las impurezas elementales pueden estar presentes en los materiales de empaque ya sea porque se agregan o son expuestas al material durante la fabricación, b) A menos que las impurezas elementales se hayan adicionado intencionalmente, los niveles de las mismas normalmente son muy bajos, y c) Si las impurezas elementales están presentes en los materiales de empaque solo una pequeña fracción puede ser lixiviada.

En todo caso los materiales de empaque como pueden ser bolsas de polipropileno para la segregación y empaque de los intermedios y producto final se deben incluir en el análisis de riesgo.

Hasta este punto se describió la clasificación, y las potenciales fuentes de contaminación de fármacos con impurezas elementales el siguiente punto es el análisis de las mismas.

Identificación de las impurezas elementales

La determinación de las impurezas elementales es de capital importancia con el objetivo de demostrar que las sustancias activas en cuestión cumplen con los límites establecidos. Hoy en día, existe toda una serie de metodologías para determinar las impurezas elementales en las sustancias activas, en este lineamiento en el capítulo 231 de la Farmacopea Estadounidense se describe un método colorímetro basado en la afinidad de las impurezas elementales por el ion sulfuro. Este método se sustituyó por las técnicas analíticas mencionadas en el capítulo 233 de la misma Farmacopea que son: espectroscopia de emisión atómica por acoplamiento de plasma inducido (procedimiento 1, USP) y la espectroscopia de masas por acoplamiento de plasma inducido (procedimiento 2). Estos métodos se describirán brevemente en los siguientes párrafos. No menos importante es el capítulo 232 en el cual se describen los límites para las impurezas elementales.

Capítulo 231 de la Farmacopea Estadounidense: Método de determinación colorimétrica

El método de determinación colorimétrica de metales pesados se llevaba a cabo mediante el uso de una disolución de sulfuro establecida en el capítulo 231 de la Farmacopea Estadounidense [24]. Este antiguo método se basa en la precipitación de una sal de sulfuro en la muestra y el resultado se establece por comparación contra una disolución de plomo estándar. Las principales desventajas de esta metodología son: la apreciación subjetiva del analista ya que el método requiere una inspección visual. Este método tampoco tiene en cuenta el impacto de la matriz de la muestra. Otra desventaja es la facilidad con la cual algunos elementos como Plomo, Mercurio, Bismuto, Antimonio, Estaño, Cadmio, Plata, Cobre y Molibdeno pueden reaccionar a pH 3 a 4 produciendo un precipitado (sal de azufre). Este método, se usa para demostrar que bajo condiciones específicas no se exceden los estándares predefinidos. Debido al cumulo de desventajas que presenta esta metodología, en la actualidad se sustituyó por técnicas analíticas más sofisticadas que se describen en la Farmacopea Estadounidense (espectroscopia de emisión atómica o espectroscopia de masas ambas por acoplamiento de plasma inducido).

Capítulo 232 de la Farmacopea Estadounidense: Límites de las impurezas elementales

La Farmacopea Estadounidense en su capítulo 232 establece los límites impurezas elementales que una sustancia activa puede contener. Se remarca el hecho de la naturaleza ubicua de los metales Arsénico, Cadmio, Plomo, Mercurio y por lo tanto se deben considerar en el análisis de riesgo y analizarse. Igualmente se hace alusión al hecho que este tipo de impurezas se encuentran de manera natural, o ser adicionadas de manera

intencional (por el uso de catalizadores) o bien pueden ser introducidas en el proceso de fabricación sin percatarse de ello (por ejemplo debido al desgaste de los equipos productivos). También se cita el concepto de especiación que es la determinación del estado de oxidación del elemento, el complejo orgánico o una combinación. Este término es importante ya que las impurezas elementales suelen adoptar diferentes estados de oxidación. Se establecen las concentraciones permitidas en microgramos por día, las cuales son impactadas por la vía de administración. También se menciona la concentración máxima permitida de estas impurezas en las formas farmacéuticas (vía oral, parenteral e inhalada) [25].

Capítulo 233 de la Farmacopea Estadounidense: Procedimientos para determinar las impurezas elementales

En el capítulo 233 de la Farmacopea Estadounidense se describen las dos metodologías para el análisis de impurezas elementales en los ingredientes farmacéuticos y las formas farmacéuticas. El método uno es la espectroscopía de emisión atómica por acoplamiento de plasma inducido y el método dos es la espectrometría de masas por acoplamiento de plasma inducido. También se describen las formas de preparación de la muestra, punto importante es que los reactivos utilizados deber estar libres de impurezas elementales. Los criterios de aceptación para la validación también son mencionados [26]. Las metodologías propuestas se describen a continuación.

Espectroscopía de emisión atómica por acoplamiento de plasma inducido (procedimiento 1, USP).

La espectroscopía de emisión atómica (radial o axial) por acoplamiento de plasma inducido se basa en el hecho de que las moléculas al ser sometidas a un plasma se excitan de tal manera que emiten fotones con una longitud de onda específica las cuales son características para cada elemento. El número de fotones es medido con un sistema óptico de alta resolución como un fotomultiplicador o un detector de estado sólido. (Figura 7, a). La emisión se relaciona directamente con la concentración del elemento en la muestra. Esta técnica tiene un límite de detección de 0.1 hasta 100 partes por billón. Una ventaja adicional es que este tipo de metodología puede evaluar alrededor de 15 elementos por muestra [27, 28].

Espectrometría de masas por acoplamiento de plasma inducido (procedimiento 2, USP).

Básicamente la espectroscopia de masas por acoplamiento de plasma inducido consiste en exponer una solución de la muestra a una fuente de calor de plasma. En el plasma la muestra se seca y disocia las moléculas. Esto es seguido por la pérdida de un electrón de

los componentes. Este hecho genera iones los cuales son inyectados al espectrómetro de masas y finalmente las señales son cuantificadas por un detector (Figura 7, b) [29]. Este método tiene una capacidad detección de 0.0001 a una parte por billón. En esta temática, Al-Hakkani reportó las principales ventajas de esta técnica analítica sobre otras las cuales se describen a continuación [30].

- Límites de detección igual o mejor que los obtenidos con espectroscopia de absorción atómica con Hornos de grafito
- Tiempos de análisis rápidos ya que todos los elementos se analizan en el mismo ensayo
- Manipulación de muestras complejas o simples con mínimas interferencias matriciales
- Obtención de información isotópica
- Sistemas especializados para la inyección de muestras pueden ser acoplados a estos sistemas

A título de ejemplo en 2017 Chahrour y colaboradores reportan la validación de método ICPMS incluido en la documentación enviada para el sometimiento ante las autoridades de un nuevo ingrediente farmacéutico. Se destaca la metodología que se desarrolló de cara a las problemáticas encontradas en la preparación de la muestra y el nivel de detalle experimental [31]. Asociado a la parte analítica se cita el trabajo de Pohl y colaboradores, en el cual se presenta una compilación de referencias y datos asociados a la preparación de las muestras y ejecución de los análisis Ejemplos de estos temas son: uso de disolventes y reactivos, estabilidad iónica, efectos de memoria, concentraciones, impacto de las matrices, uso de excipientes, interferencias, etc. [32].

Para concluir esta sección, en la figura 7 se muestra un esquema de las metodologías descritas en el capítulo 233 de la Farmacopea Estadounidense.

Análisis de riesgo para determinar las potenciales impurezas elementales en la sustancia activa

Una vez terminada la fabricación de una sustancia activa es necesario verificar que la misma cumpla con los límites establecidos. Por lo que se deben contemplar todas las impurezas metálicas ya sea adicionada al proceso directa o indirectamente. La pregunta obligada es ¿Cómo saber qué impurezas metálicas se deben analizar en el producto final? Esta evaluación puede llevarse a cabo mediante un análisis de riesgo. La ICHQ9 [33] establece los lineamientos para llevar a cabo el análisis de riesgo incluyendo los siguientes puntos:

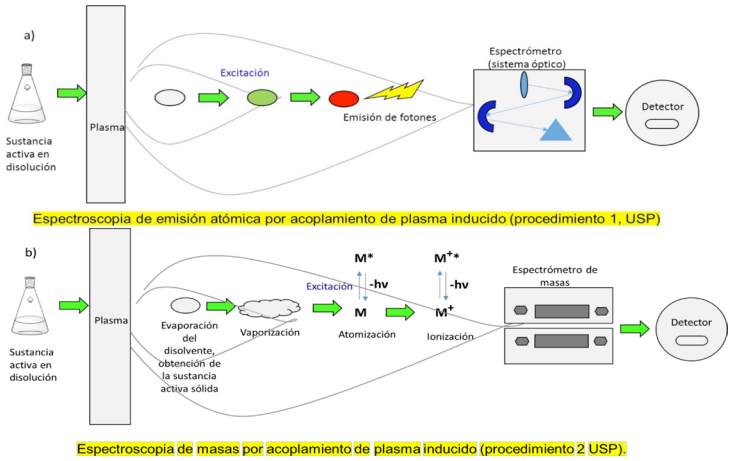


Figura 7. Técnicas analíticas propuestas por la USP para la determinación de impurezas elementales

- Identificación del riesgo,
- Evaluación del riesgo,
- Comunicación del riesgo
- Monitoreo de los cambios.

En esta misma tesitura, Sharma y colaboradores proponen en una reciente publicación una metodología de cinco pasos para llevar a cabo el análisis de riesgo de las impurezas elementales [34]:

1. Identificación de las potenciales fuentes conocidas de impurezas elementales
2. Recolección de datos
3. Cálculo de las dosis diarias permitidas
4. Análisis de los lotes de Sustancia activa
5. Estrategia de control

Paso 1. Identificación de las potenciales fuentes conocidas de impurezas elementales (identificación del riesgo)

En esta etapa se hace la evaluación de las potenciales fuentes de impurezas provenientes de las materias primas (materias primas claves, reactivos, catalizadores, agua, disolventes, ayuda filtros, envases primarios, etc.) y de los equipos productivos así como

accesorios (material de construcción de los reactores, centrífugas, secadores, molinos. Aditamentos de los equipos como: válvulas, juntas, filtros, bolsas, sistemas de cierre y almacenaje, etc.

Paso 2. Recolección de datos (evaluación del riesgo)

La información recopilada en el paso 1 se debe evaluar y revisar. Ejemplo de información a revisar es: conocimiento previo de las síntesis, histórico de datos, datos publicados en la literatura, datos de otros procesos similares, información proporcionada por los proveedores acerca de los materiales, pruebas realizadas con las sustancias activas, hojas de seguridad, etc.. Factores adicionales a tener en cuenta durante la evaluación son: eficiencia del proceso para eliminar las impurezas elementales, abundancia natural de los metales, conocimiento de la aportación del contenido de impurezas de cualquier componente que participa en la fabricación de la sustancia activa. Por ejemplo, materias primas dentro de las cuales se pueden mencionar: materiales de partida, ayuda filtros, disolventes, agua, catalizadores, carbón activado, etc.

Paso 3. Cálculo de las dosis diarias permitidas (control de riesgo)

Se debe evaluar el objetivo para el cual se plantea el uso de la sustancia activa fabricada, es decir la vía de administración. Por lo que el análisis de riesgo debe incluir alguna de las siguientes opciones:

- **Opción 1**: Limites de concentración para sustancias activas cuya dosis diaria no debe ser mayor a 10 gramos.
- **Opción 2a**: Concentración permitida para sustancias activas cuya dosis diaria permitida es específica.
- **Opción 2b**: Límites de concentración permitida para componentes individuales de un producto con dosis específica.
- **Opción 3**: Análisis de productos finales.

Paso 4. Análisis del lote (monitoreo de los cambios)

Datos de tres lotes representativos de producción a nivel escalado pueden servir para establecer el nivel de variabilidad de cada impureza elemental si no se tiene otra justificación.

Paso 5. Estrategia de control

Se necesita definir claramente la estrategia de control y justificarla. Así como precisar el umbral de control para cada impureza a un nivel del 30% de la dosis diaria permitida.

Si se demuestra consistentemente que los valores obtenidos se encuentran por debajo del 30% de la dosis diaria permitida no se requerirán controles adicionales. Si esto no es demostrable se requerirán controles adicionales que confirmen que se tiene control sobre el contenido de impurezas elementales. Por ejemplo, control de los límites de impurezas metálicas en las materias primas, cambios en el proceso de fabricación (uso de secuestradores de metales), controles de proceso para minimizar el contenido de algún metal específico antes de llegar al producto final, etc.

En los párrafos siguientes se describirá un ejemplo de análisis de riesgo.

Síntesis de Sitagliptina (Caso de estudio)

Como se ha mencionado el análisis de riesgo consiste en la identificación de peligros, análisis y evaluación de los riesgos asociados con la exposición a esos peligros. En nuestro contexto se debe preguntar ¿qué impurezas metálicas podrían encontrarse en la sustancia activa? Con base en lo anterior, la síntesis de primera generación para la Sitagliptina (antidiabético) servirá como caso de estudio. En este ejemplo el riesgo es la posible presencia de impurezas elementales que podrían encontrarse en el producto final (Figura 8), por lo cual el ejercicio consistirá en hacer la respectiva evaluación.

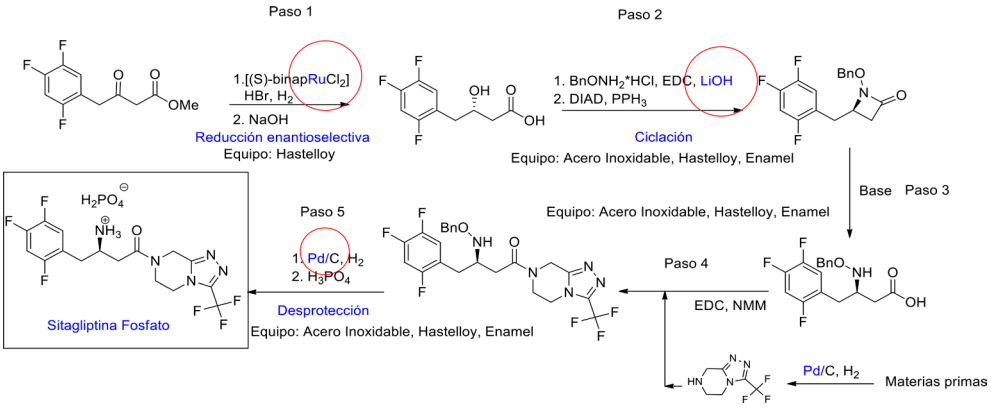


Figura 8. Evaluación de las impurezas elementales en la Sitagliptina Fosfato (Proceso de 1ª generación)

Paso 1. Identificación de las potenciales fuentes conocidas de impurezas elementales

Aportación por la síntesis: Como se observa en la figura 8, en la primera etapa del proceso se utilizó un catalizador de Rutenio para hacer la reducción enantioselectiva de la acetona. En segundo lugar, el Hidróxido de Litio neutralizó el clorhidrato del grupo

protector. Después se continuó con una reacción de Mitsunobu con la finalidad de poder formar la amida cíclica. En el paso 4 se hidrolizó la amida cíclica dando origen al ácido libre. En el último intermedio (paso 5) se utilizó Paladio sobre carbón para poder desproteger la función amina obteniendo la Sitagliptina base y subsecuentemente la sal de fosfato. Es necesario mencionar el uso de Paladio en la síntesis de la función Piperidina [35]. Por lo tanto, durante el análisis de la sustancia activa mediante esta ruta sintética se deberían evaluar en el producto final: Rutenio, Litio y Paladio ya que estos reactivos / catalizadores se agregaron intencionalmente al proceso.

A título de comentario, se debe mencionar que el uso de Rutenio, Litio y en la desprotección de la amina se ha evitado en un proceso de síntesis de 3ª generación [36]. No obstante en la reacción de reducción del fragmento que proporciona la función Piperidina aún usa el Paladio sobre carbón en la síntesis. Por lo que teóricamente en una potencial evaluación de las impurezas metálicas de este segundo proceso, sólo se evaluaría el contenido de Paladio y las impurezas metálicas aportadas por los equipos de fabricación.

Aportación por los equipos de fabricación: En segunda instancia se deben evaluar los equipos de fabricación se infiere que para el primer paso (hidrogenación) se utilizó un reactor resistente a la corrosión por ácido bromhídrico y resistente a la presión es decir un Hidrogenador de hastelloy. Lo que implicaría incluir en la evaluación los siguientes metales potencialmente aportados por el equipo: Níquel, Cobalto, Vanadio, Molibdeno, Cromo y Cobre.

En el segundo paso sintético que es una reacción de Mitsunobu, al no tener condiciones agresivas se intuye el uso de un reactor de acero inoxidable que potencialmente aportaría los siguientes metales: Níquel, Molibdeno, Cromo y Manganeso. La siguiente reacción es la formación de un enlace peptídico utilizando condiciones estándar que tampoco son agresivas. Por dicha razón se puede utilizar un reactor de acero inoxidable. Para la cuarta etapa sintética se utiliza un hidrogenador en la cual se podría utilizar hastelloy o acero inoxidable. Finalmente, en la formación de la sal de fosfato se pueden utilizar reactores de hastelloy o de acero vitrificado. Con lo que se aportarían en el caso de hastelloy los metales previamente mencionados y para el caso de acero vitrificado Silicio, Boro, Magnesio y Aluminio. Estos últimos elementos no están clasificados como tóxicos por lo tanto se descarta su cuantificación. Finalmente, el resultado del análisis en cuanto a que impurezas pueden estar presentes en el principio activo es el siguiente:

- **Síntesis:** Pd, Ru, Li
- **Equipos de Hastelloy:** Ni, Co, V, Cr, Mo.
- **Equipos de Acero inoxidable:** Ni, Mo, Cr, Mn.

Paso 2. Recolección de datos

La ruta sintética incluye los disolventes de síntesis, después de revisar los mismos no se encontró algún disolvente que pudiera aportar alguna impureza elemental adicional. No obstante, la revisión de la ruta sintética de la materia prima que porta la función Piperidina indica que se fabricó utilizando una reacción de hidrogenación con Paladio. Esta impureza elemental ya se incluyó en posteriores etapas sintéticas pero es importante mencionarla en el análisis de riesgo. Dado que se han identificado las potenciales impurezas que pueden ser aportadas durante el proceso de manufactura tanto por la síntesis como por los equipos de fabricación, se puede confirmar que existe una probabilidad de ocurrencia.

Paso 3. Cálculo de las dosis diarias permitidas

Suponiendo que se toma la opción 1 (Límites de concentración para sustancias activas cuya dosis diaria no debe ser mayor a 10 gramos) cuya vía de administración es oral y teniendo en cuenta la opción de seguridad, es decir un 30% de la dosis indicada en la guía ICHQ3D. Los metales a analizar son:

Para el caso de los elementos de la clase 1 (Cd, Pb, As, Hg) y 2A (Co, V, Ni) debido a su toxicidad se deben analizar y cuantificar siempre (aunque no se hayan agregado en la síntesis). Adicionalmente el Co, el V y el Ni pueden potencialmente ser aportados por los equipos de fabricación. En lo que respecta a los elementos de la clase 2B se deben determinar para este caso específico Paladio y Rutenio ya que fueron agregados a la síntesis. Para los metales de la clase 3 se deberá analizar Litio, Molibdeno y Cobre, el primero por utilizarse en la síntesis y los siguientes porque pueden ser aportados potencialmente por los equipos de fabricación.

Los límites se establecen mediante la guía ICHQ3D, por lo tanto el análisis deberá proporcionar resultados debajo de estos límites. Por otra parte, si se demuestra que el análisis proporciona un valor del 30% con respecto a los límites establecidos no habrá que rehacer este tipo de análisis ya que cumpliendo con este dato se demostrará que la fabricación está controlada. Se remarca el hecho que esta es una aproximación, las empresas dedicadas a la fabricación de sustancias activas tienen descritos en sus propios procedimientos normalizados que pueden diferir de la propuesta presentada. En todo caso, se deberán evaluar todos los metales obligatorios, los añadidos y los que pudieran provenir del uso de equipos.

Análisis del lote y estrategias de control (Pasos 4 y 5) Eliminación de las impurezas elementales de las sustancias activas

Una vez identificado el riesgo y su probabilidad, se debe atender el siguiente cuestionamiento: ¿Qué se puede hacer para reducir o eliminar los riesgos? A continuación se describen algunas estrategias:

Tabla 3. Resultados para el caso de estudio (Sitagliptina)

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
1	Cadmio	Cd	SI	SI	0,5	0,15	SI	Estas impurezas no se agregaron intencionalmente al proceso. Debido a la toxicidad inherente se considera en el análisis de riesgos
	Plomo	Pb			0,5	0,15		
	Arsénico	As			1,5	0,45		
	Mercurio	Hg			3	0,9		
2A	Cobalto	Co	SI	SI	5	1,5	SI	Estas impurezas aunque no se agregaron intencionalmente al proceso, pueden provenir de los equipos de fabricación. Debido a la toxicidad inherente se considera en el análisis de riesgos
	Vanadio	V			10	3		
	Níquel	Ni			20	6		

Table 3. *(Continúa).*

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
2B	Paladio	Pd	SI	NO	10	3	SI	La impureza se agrega intencionalmente como catalizador en dos etapas sintéticas. El Paladio se debe tener en cuenta en el análisis de riesgos.
	Rutenio	Ru			10	3	SI	El Rutenio se agrega intencionalmente como catalizador en una etapa de síntesis. Por lo tanto, el Rutenio se debe tener en cuenta en el análisis de riesgos.

Table 3. *(Continúa)*.

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
2B	Talio	Tl	SI	NO	0.8	0.2	NO	Ninguna de estas impurezas se agregó intencionalmente a este proceso. Después de revisar los procesos de fabricación de estas materias estas materias se concluye que no se utilizar ni se detectaron estos compuestos para la fabricación. A tal efecto no se debe incluir esta determinación en el análisis de riesgos.
	Oro	Au			10	3		
	Iridio	Ir			10	3		
	Osmio	Os			10	3		
	Rutenio	Ru			10	3		
	Selenio	Se			15	5		
	Plata	Ag			15	5		
	Platino	Pt			10	3		
3	Litio	Li	SI	NO	55	17	SI	El Litio se utiliza en una etapa de síntesis por lo tanto se debe incluir en el análisis de riesgo

Table 3. *(Continúa).*

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
3	Molibdeno	Mo			300	90	SI	Ni el Molibdeno, ni el Cobre se agregaron intencionalmente a este proceso, pero pueden ser aportados por los equipos de fabricación. Motivo por el cual se deben incluir estas dos impurezas elementales en el análisis de riesgo.
	Cobre	Cu			300	90	SI	

Table 3. *(Continúa)*.

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
3	Antimonio	Sb			12	4	NO	Ni el Antimonio, ni el Bario, ni el Estaño se agregaron intencionalmente a este proceso. Después de revisar los procesos de fabricación de estas materias primas se concluye que no se utilizaron, ni se detectaron estos compuestos para la fabricación. A tal efecto no se debe incluir esta determinación en el análisis de riesgos.
	Bario	Ba			140	42		
	Estaño	Sn			600	180	NO	

Table 3. *(Continúa).*

Clase	Elemento	Símbolo	Ejecución del análisis si la Impureza SI agrega intencionalmente para todas las vías de administración	Ejecución del análisis si la Impureza NO es agregada intencionalmente	Límites de concentración (µ/g)		Se deberá analizar como resultados del análisis de riesgo	Justificación
				Oral	Oral	Margen de seguridad concentración oral x 30%		
3	Cromo	Cr			1100	330	SI	No se agregó intencionalmente cromo al proceso de fabricación, pero puede ser aportado por los equipos de fabricación. Motivo por el cual se deben incluir estas dos impurezas elementales en el análisis de riesgo.

El uso de catalizadores en la química de procesos cada vez es más extenso, por ejemplo en los principios activos aprobados por la FDA se puede apreciar que el uso de catalizadores en la síntesis de sustancias activas cada vez es más frecuente. Siendo el Paladio y el Litio los más utilizados. En la Tabla 4 se observan los metales que se han utilizado en la fabricación de sustancias activas en el periodo comprendido de 2013 a 2018. Estos datos indican que el uso de catalizadores es cada vez extendido, esto se debe a que este tipo de química permite sintetizar moléculas complejas difícilmente obtenidas hasta ahora por otros métodos. El uso de estos catalizadores tiene la tarea implícita de disminuir las concentraciones hasta los niveles permitidos por las regulaciones (ICHQ3D). Por lo tanto, se deben establecer estrategias adecuadas para eliminar los derivados metálicos de la síntesis. Algunas de estas estrategias se discutirán brevemente en la siguiente sección.

Métodos de control de las impurezas metálicas en las sustancias activas

Debido a la toxicidad de las impurezas metálicas es mandatorio retirarlas del medio de reacción con el objetivo de disminuir los niveles en el principio activo aislado. Las técnicas habituales para realizar esta tarea son: la filtración, la adsorción, extracción y el secuestro de los metales en disoluciones. Es importante mencionar que los límites tan bajos solicitados por la guía ICHQ3D en ocasiones llevan a la combinación de las metodologías o al nuevo desarrollo de ellas.

Filtración y adsorción. Los metales utilizados para la síntesis de sustancias activas pueden proporcionar medios de reacción homogéneos o heterogéneos. Para una catálisis heterogénea es relativamente fácil retirar el reactivo metálico porque el mismo está anclado a un soporte insoluble. El ejemplo clásico es el Paladio sobre carbón, así que una vez que termina la reacción se puede retirar fácilmente mediante filtración. Se suelen utilizar filtros de celulosa provistos de tierras diatomeas.

El caso es diferente cuando se lleva a cabo una síntesis en fase homogénea ya que el catalizador se encuentra en disolución y para ser removido debe ser adsorbido en un medio insoluble o por un secuestrador de metales. Por ejemplo algunos catalizadores pueden ser adsorbidos en carbón activo que tiene la función bivalente de adsorber el catalizador y eliminar impurezas. Una vez el catalizador adsorbido sobre el carbón, se puede eliminar mediante filtración. En el mercado existen diversos tipos de carbón activo con diferentes funcionalidades, si bien el origen del mismo puede orientar cuando se desarrolla un proceso, habitualmente es necesario verificar experimentalmente si es el adecuado para remover los metales de la sustancia activa. Una de las mayores desventajas de esta metodología es que en ocasiones las sustancias activas o intermediarios sintéticos se adsorben sobre la superficie del carbón, lo que implica

una pérdida de rendimiento, que dependiendo del valor agregado al producto se puede o no asumir. Otra alternativa es el uso de soportes comerciales basados en polímeros de silicio o poliestireno que pueden tener alguno de los siguientes grupos funcionales: Sulfidrilo, aminas primarias, triaminas, tioureas, benzilaminas y piridinas son una de las alternativas primarias [37]. La decisión de este tipo de reactivos se basa en un ensayo error en laboratorio ya que puede haber interacciones con los grupos funcionales de la sustancia activa. La limitante de esa metodología es la aplicación a nivel industrial ya que los precios son onerosos, aunque como ya se mencionó el valor agregado a la sustancia activa justifica su uso.

Secuestradores de metales en solución. En ocasiones la filtración y adsorción no son suficientes para eliminar todo el catalizador presente en el medio de reacción, por tal motivo se deben usar secuestradores de metales en solución. Los secuestradores de metales son moléculas que reaccionan con las impurezas metálicas haciendo que las impurezas metálicas derivadas sean más solubles en agua. En este tipo de aislamiento el principio activo o intermedio usualmente se precipita, se aísla por centrifugación y las impurezas metálicas son eliminadas en las aguas madres. Otras alternativas comerciales están disponibles en el mercado, por ejemplo se diseñaron diversos tipos de equipos como filtros o columnas los cuales se pueden precargar con cartuchos provistos de soportes preparados específicamente para reaccionar con las impurezas metálicas. Las disoluciones de sustancias activas o intermedios pueden filtrarse directamente a través de estos sistemas de purificación (filtración directa) y recolectarse en un reactor que contendrá la disolución libre de impurezas metálicas. También se puede recircular la disolución sobre el filtro o equipo precargado del reactivo secuestrador y la eliminación de las impurezas elementales se va realizando paulatinamente. Una vez que el contenido se encuentra en el rango establecido se detiene la purificación y la disolución se obtiene libre de impurezas metálicas [38].

Extracción. Los grupos funcionales que más se utilizan como secuestradores en este tipo de metodología son compuestos de azufre (por ejemplo cisteína) y poliamidas. Este tipo de moléculas reaccionan con los catalizadores haciendo que los compuestos derivados sean más solubles en agua. Este hecho permite desarrollar métodos de purificación basados en la afinidad del metal derivatizado por los medios acuosos mientras la sustancia activa o intermediario se mantienen en la fase orgánica. En este punto las fases pueden separarse fácilmente dejando libre la disolución orgánica de la sustancia activa. En este mismo contexto, algunas compañías comerciales crearon soportes que contienen diversos tipos de grupos funcionales que permiten reaccionar con las impurezas elementales secuestrándolas, después los derivados son eliminados mediante extracción y como consecuencia se obtiene un producto libre de impurezas elementales.

Tabla 4. Metales utilizados en la síntesis de sustancias activas periodo 2013 a 2018

Año de aprobación de Sustancia activa	METALES UTILIZADOS EN LA SINTESIS DE SUSTANCIAS ACTIVAS PERIODO 2013 A 2017											
	Paladio	**Litio**	**Magnesio**	**Rutenio**	**Cobre**	**Zinc**	**Platino**	**Manganeso**	**Níquel**	**Estaño**	**Iridio**	**Rodio**
2013 [39]	Cobicistat Dolutegravir Gemigliptina Lomitapida Olodaterol Pomalidomida Riociguat Vortioxetina	Afatinib Cobicistat Dabrafenib Dolutegravir Efinaconazol Elvitegravir Gemigliptina Simeprevir Sofusbuvir Trastuzumab	Canagliflozina Elvitegravir Olodaterol Sofusbuvir	Dolutegravir Simeprevir	Gemigliptina	Ospemifeno Trastuzumab	Olodaterol	Sofusbuvir	Afatinib, Simeprevir	Sofusbuvir	---	---
2014 [40]	Alectinib Apatinib Belinostat Ceritinib Dasabuvir Delamanid Eliglustat Ledipasvir Luseogliflozina Nintedanib Ombitasvir Tedizolid Tofogliflozina Vonoprazam Vorapaxar Vaniprevir	Asunaprevir Eliglustat Ipragliflozina Ledispasvir Tavaborole Tedizolid Tofogliflozina Umeclidinium Vonoprazam Vorapaxar Vaniprevir	Empagliflozina Ledipasvir Luseogliflozina Netupitant Tofogliflozina	Paritaprevir Vaniprevir	Dasabuvir Vonoprazam	Idelalisib Ombitasvir	Ceritinib	Netupitant	Ombitasvir	---	---	Apremilast

Table 4. *(Continúa).*

Año de aprobación de Sustancia activa	METALES UTILIZADOS EN LA SINTESIS DE SUSTANCIAS ACTIVAS PERIODO 2013 A 2017											
	Paladio	**Litio**	**Magnesio**	**Rutenio**	**Cobre**	**Zinc**	**Platino**	**Manganeso**	**Níquel**	**Estaño**	**Iridio**	**Rodio**
2015 [41]	Ozenoxacina Cariprazina Flibanzerin Eluxadolina Rolapitant Ácido deoxicólico Evogliptina Lesunirab Polmacoxib Cobimetinib Palbociclib Sonidegib	Isavuconazol Eluxadolina Rolapitant Ácido deoxicólico Polmacoxib Cobimetinib Palbociclib	Sacubitril Lusutrombopag Lesunirab Omarigliptina, Palbociclib	Sacubitril, Lusutrombopag Omarigliptina	Sacubitril Brexpiprazol Rolapitant Trelagliptina Esflurbiprofeno	Evogliptina	Safinamida	Polmacoxib	---	Ozenoxacina	---	---
2016 [42]	Beclavubir Elbasvir Grazoprevir Narlaprevir Nemonaxina Primavanserin Ácido obeticolico Migalastato Rucaparib Venetoclax	Grazoprevir, Narlaprevir, Nemonaxina Velpatasvir Zabofloxacina, Crisaborole, Liftegrast	Tenofovir Velpatasvir Venetoclax	Elbasvir	---	Grazoprevir, Narlaprevir	---	---	---	---	---	---

Table 4. *(Continúa).*

Año de aprobación de Sustancia activa	METALES UTILIZADOS EN LA SINTESIS DE SUSTANCIAS ACTIVAS PERIODO 2013 A 2017											
	Paladio	**Litio**	**Magnesio**	**Rutenio**	**Cobre**	**Zinc**	**Platino**	**Manganeso**	**Níquel**	**Estaño**	**Iridio**	**Rodio**
2017 [43]	Delafloxacina Pibrentasvir Letermovir Voxilaprevir Ertugliflozina Pemafibrato Baricitinib Abemaciclib Acalabrutinib Brigatinib Copanlisib Ribociclib Telotristat Tivozanib	Delafloxacina, Esulfavirina, Glecaprevir Pibrentasvir, Vaborobactam, Enasidenib, Telotristat, Netarsudil	Pibrentasvir Voxilaprevir Ertugliflozina Telotristat	Glecaprevir Voxilaprevir	Nlademedina, Abemaciclib, Ribociclib	Voxilaprevir	Voxilaprevir Betrixaban Copanlisib Neratinib	---	---	---	Vaborbactam Telotristat	---
2018 [14]	Eravaciclina Omadaclina Plazomicina Sareciclina Tafenoquina Revefenacina Roxadustato Tegoprazan Elagolix Evocalcet Anlotinib Binimetinib Dacomitinib Encorafenib Gilteritinib Ivosidenib Lorlatinib Plitidepsina Tezacaftor	Eravaciclina, Baloxavir, Danoprevir, Elobixibat, Encorafenib, Glasdegib, Plitidepsina	Baloxavir Bictegravir Duvelisib Eravaciclina Rovuconazo Larotrectinib Tezacaftor Vibegron	Danoprevir	Doravirina, Glasdegib, Vibegron	Plazomicina, Tegoprazan, Apalutamida Tezacaftor	Apalutamida Larotrectinib Tezacaftor Vibegron	---	---	---	Doravirina	---

Caso de estudio: Disminución del contenido de Paladio en una sustancia activa

El Paladio se ha utilizado para llevar a cabo diversas transformaciones entre las que se puede mencionar, reducciones, carbonilaciones, transmetalaciones, acoplamientos, etc. [45]. Una vez terminado el proceso, se deben establecer metodologías para eliminar este catalizador y sus derivados del medio de reacción, con el objetivo de cumplir con los límites especificados en la regulación (5 ppm para una forma farmacéutica oral y 0.5 ppm para una administración parenteral). Se han desarrollado diversos métodos para la eliminación de esta impureza. En esta línea, Garret en 2004 describe los métodos para eliminar Paladio de las sustancias activas en su revisión acerca de este tópico [46]. Dentro de estas metodologías se mencionan: la adsorción sobre diversos soportes con grupos funcionales tales como aminas, trimercaptotriazinas o grupos sulfidrilos. Otras opciones comerciales son compuestos análogos que contienen grupos funcionales susceptibles de unirse al Paladio. También se menciona el uso de carbón activo. La desventaja de este último es la manipulación del material en la planta productiva ya que se traduce en más ocupación de equipos y dificultad de la limpieza. Adicionalmente, el carbón activo una vez que secuestró al paladio se debe remover del medio de reacción. A pesar del tema de ocupación de equipos, esta opción es una de las más económicas y asequibles. La N-acetilcisteína es otra muy buena opción para eliminar el Paladio de una solución, se suele disolver la N-acetilcisteina en agua y se precipita el producto orgánico en el medio acuoso. Como resultado el Paladio unido a la N-acetilcisteína forma compuestos que son muy solubles en agua y fácilmente eliminables del medio de reacción. Otras sustancias como n-tributilfosfina y Cisteína también se han utilizado. Es común la combinación de secuestradores para hacer que los niveles de Paladio cumplan con las estrictas regulaciones (por ejemplo el uso de carbón activo, seguido de precipitación del producto en agua con una disolución acuosa de N-acetilcisteina). En la Figura 9 se resumen las operaciones unitarias para eliminar Paladio en una sustancia activa. En el siguiente apartado se cita a título de ejemplo el desarrollo de una metodología para disminuir el contenido de Paladio en una sustancia activa.

Ejemplo de reducción del contenido de Paladio en una sustancia activa (Caso de estudio reportado en la literatura)

Los límites estrictamente bajos establecidos por las autoridades (ICHQ3D) han brindado la oportunidad de desarrollar nuevos secuestradores de Paladio con objeto de dejar cantidades residuales en las sustancias. En este contexto, se reportó recientemente un estudio por Ren y colaboradores con el Ceftolozano (antibiótico) cuyo objetivo se centró en la reducción del contenido de Paladio residual en la sustancia activa. Se parte del hecho en el que el crudo de reacción contenía 2000 ppm, después de un tratamiento con tioglicerol se obtuvo un crudo de reacción con alrededor de 50 ppm de Paladio.



Figura 9. Esquema de operaciones unitarias para eliminar Paladio.

Esta concentración es con la que se inició estudio. El contenido residual no cumplió con la especificación ya que la concentración permitida en la sustancia activa es de 1 ppm. Claramente, el objetivo en este punto del proyecto fue continuar evaluando las opciones para reducir al mínimo la concentración de esta impureza metálica.

Durante el estudio se probaron diversos tipos de técnicas, el primer intento fue basándose en una extracción lo que llevó a un contenido de impurezas de 40 ppm. Esta técnica realmente no tuvo impacto por lo que se necesitó desarrollar otro método. En la segunda alternativa se utilizaron diversos carbones activos comerciales, el resultado fue no menos de 30 ppm. Después se probaron disoluciones de agentes quelantes, aunque con esta opción se logró obtener niveles de Paladio de 10 ppm, las condiciones operativas no fueron adecuadas ya que se requirieron volúmenes de reacción excesivos y esto no es viable a nivel productivo. La siguiente metodología que se utilizó fue el uso de compuestos de azufre, específicamente una molécula con un grupo tiocarbamato. El resultado brindado fue de 35 a 0.5 ppm. Estos niveles fueron adecuados no obstante en la etapa final de la síntesis (formación de la sal de la sustancia activa) se usa un pH bajo (2 a 3 unidades) lo que no permitió utilizar este tipo de secuestradores debido a su inestabilidad en pH ácido. La alternativa fue utilizar ditiocarbamos, los cuales son estables en medios ácidos, en concreto para este proyecto se utilizó el tiocarbamato de isopropilo. Finalmente, con el objeto de incrementar la purificación de Paladio con valencia cero, se agregó Iodo para poder convertir el metal a un derivado con valencia dos el cual aumentó la solubilidad de este compuesto en el medio por ende un efecto sinérgico de purificación de paladio por el ditiocarbamato de isopropilo unido a un paladio valencia dos. Este hecho proporcionó contenido de Paladio en concentraciones de 32 a 0.16 ppm. Esta metodología se mejoró hasta obtener niveles de paladio inferiores a 1 ppm [47]. Las ventajas adicionales de este proceso son la fácil disponibilidad y bajo costo de los reactivos. En la figura 10 se reporta la evolución del estudio.

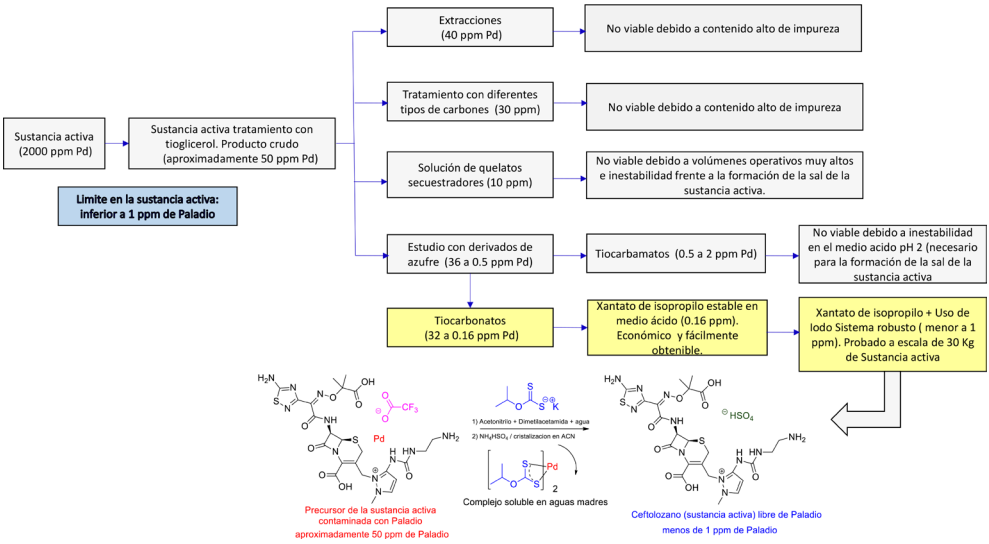


Figura 10. Esquema de desarrollo de la metodología de eliminación de Paladio descrita por Ren y cols. [47].

Tendencias en la mejora de secuestradores, tecnología analítica para la purificación y análisis de las impurezas elementales

La constante evolución de los procesos de fabricación de las sustancias activas cada vez incluye más el uso de catalizadores metálicos. Esto aunado a las vías de administración hace que los límites de impurezas elementales sean muy restrictivos. Esta razón ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan el control exhaustivo de las impurezas elementales en las sustancias activas, aunado a esto se necesita el desarrollo de tecnologías analíticas cada vez más sensibles.

Por ejemplo, para la eliminación de impurezas elementales se están desarrollando nuevos secuestradores que puedan actuar en fase soluble. Esto permitirá utilizar el secuestrador en una disolución que retire específicamente una impureza metálica eficientemente. Dichos secuestradores se podrán preparar a partir de sustancias con grupos quelantes mediante una polimerización. Lo que dará como resultado un polímero funcionalizado soluble en un disolvente orgánico. Ejemplo de este tipo de avance se reportó recientemente por Chouiki y cols. [48]. Se preparó un polímero de isobutileno funcionalizado con grupos sulfidrilo. Este polímero es soluble en alcanos y se demostró su uso para eliminar Paladio y Cobre en reacciones de acoplamiento utilizando estos mismos metales. La eficiencia osciló de 95 a 99%. El proceso de purificación consistió en hacer una extracción en heptano agua o en metanol / heptano (estas mezclas son inmiscibles). Desde el punto de vista productivo este tipo de alternativas es muy atrac-

tiva ya que podría utilizarse el secuestrador como una operación unitaria en el proceso de fabricación de las sustancias activas (una extracción). Por otro lado, el uso de una sal orgánica haría que la sustancia activa o el intermediario permanecieran en la fase acuosa (debido a la formación de un enlace iónico) [49] y la disolución del secuestrador en la fase orgánica (heptano), este tipo de recurso seguramente proporcionaría una excelente metodología para eliminar impurezas elementales de las sustancias activas.

Las tendencias tecnológicas en cuanto a secuestradores también se enfocan en utilizar soportes insolubles tales como: carbones activos, óxidos de metales, polímeros y óxidos de otros metales. Un tema especialmente interesante es sopórtalos sobre otros metales que tengan propiedades magnéticas. Esto tendría la ventaja de poder eliminar el catalizador utilizando un campo magnético [50].

Otra alternativa es realizar las reacciones químicas análogas a los metales de transición, pero sin metales de transición, este tipo de síntesis permitiría generar ingredientes farmacéuticos libres de impurezas elementales. Así mismo no se tendrían que gestionar los residuos con metales de transición que en general son muy voluminosos y costosos. Aunque esta química verde es una alternativa muy rentable y ecológica, desafortunadamente no todas las trasformaciones asociadas a los metales de transición pueden ser mimetizadas. No obstante, algunas cuantas probablemente se puedan tener en cuenta en un futuro cercano en la síntesis de sustancias activas [51].

Por otra parte, en lo que respecta al tema analítico, el hecho de tener que disminuir el contenido de impurezas elementales a niveles muy bajos, hace imprescindible la necesidad del desarrollo de una instrumentación extremadamente sensible para poder analizar correctamente esos valores tan bajos. Específicamente en cuanto a la espectroscopia de masas o de absorción por acoplamiento inducido, las tendencias tecnológicas para mejorar las resoluciones y eliminar interferencias se basan en mejorar el sistema óptico, los inyectores de muestras, los generadores de radio frecuencia, el software, algoritmos para la adquisición y análisis de datos. También se puede mencionar la mejora en las antorchas para el acoplamiento de plasma inducido [52]. Mejoras tecnológicas se implementaron con la combinación de diferentes técnicas (técnicas hifenadas) por ejemplo mezclando la laser ablación ICP con espectroscopia de ruptura inducida por láser para el uso en muestras sólidas [53]. Otra alternativa analítica es el uso de la espectrometría fluorescente de Rayos X. En un reciente estudio enfocado en el desarrollo y validación de un nuevo método para la determinación de impurezas elementales en formas farmacéuticas orales utilizando la técnica antes mencionada, precisamente, Sauer y colaboradores demostraron que esta técnica analítica es una alternativa para el análisis de impurezas elementales en las formas farmacéuticas. Las principales ventajas de esta metodología son: tiempos de análisis muy

cortos, bajo costo, corta capacitación para el personal y las calibraciones son estables por largos periodos. En este estudio se llevó a cabo el desarrollo y la validación del método [54]. Este trabajo estableció bases para la utilización de esta técnica en el análisis de impurezas elementales en sustancias activas. Como se observa, en general el desarrollo tecnológico está a la orden del día en cuanto a técnicas analíticas y desarrollo de secuestradores de metales

Conclusión

La compleja funcionalización de las sustancias activas que hoy en día se están aprobando por las autoridades, en muchas ocasiones requiere el uso de catalizadores metálicos, los cuales permiten la síntesis de dichas moléculas difícilmente obtenibles por otros métodos. Los equipos productivos necesarios para fabricar las sustancias activas también pueden ser fuentes potenciales de impurezas elementales, ya que el uso de catalizadores o erosión de los equipos de fabricación generan residuos que deben ser eliminados de las sustancias activas, principalmente porque las impurezas elementales son tóxicas para el paciente. Por tal motivo, se necesita desarrollar metodologías de control basadas en el uso de secuestradores de impurezas elementales. Se remarca el uso del análisis de riesgo como herramienta para evaluar el impacto de cada impureza metálica en el principio activo. Así mismo, la correcta evaluación analítica juega un rol preponderante, en esta tesitura el uso de la ICPMS genera resultados mucho más confiables con respecto al método colorimétrico. Finalmente, los avances tecnológicos con nuevos secuestradores que reaccionen específicamente y que sean factibles para su uso a nivel industrial, seguramente impactarán en el aumento de la inclusión de este tipo de catalizadores creando cada vez estructuras más complejas y facilitando la síntesis de nuevos fármacos, lo que continúa beneficiando la salud de los pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. B.K. Immel, A brief history of the GMPs for Pharmaceuticals, *Pharm. Technol.*, July 2001, 44-52 (2001).

2. J. Tatarkiewicz, M.J. Bujalska-Zadrozny, The antihypertensive drugs and contamination with carcinogenic nitrosamines, *Folia Cardiol.*, **14**(6), 564-571 (2019).

3. United States Food and Drug Administration. Statement alerting patients and health care professionals of NDMA found in samples of Ranitidine. [Internet] United States; 2019 [updated 2019 September 13] URL: http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine, consultado Marzo de 2021.

4. Cofepris. Norma oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas Prácticas de fabricación de fármacos [Internet]. México: Cofepris; 2016 [updated 2016 February 4]. Available from: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424377&fecha=04/02/2016, consultado noviembre de 2021.

5. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients Q7 [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2000 [updated 2000 November 10]. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf, consultado Marzo 2022.

6. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Impurities in new drug substances Q3A(R2) [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2006 [updated 2006 October 25]. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2__Guideline.pdf, consultado Marzo 2022.

7. J.C. Ortiz-Lara, S. Flores-Teloxa, I.R. Contreras-Mora, A. Díaz, Impurezas orgánicas observadas en el proceso de manufactura de las sustancias, *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **47**(1), 7-24 (2016).

8. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for residual solvents Q3C R6) [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2016 [updated 2016 October 20]. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3C-R6_Guideline_ErrorCorrection_2019_0410_0.pdf, consultado Marzo 2022.

9. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit

potential carcinogenic risk M7 (R1) [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2017 [updated 2017 March 31]. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf, Consultado Marzo de 2022.

10. L. Muller, R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. DeGeorge, A.G.M. De Knaep, D. Ellison, J.A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C.D.N. Humpfrey, A.S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D.K. Ness, M.R. O´Donovan, M.D. Smith, G. Vudathala, L. Yotti, A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **44**, 198-211 (2006).

11. C. Pan, F. Liu, M. Motto, Identification of pharmaceutical impurities in formulated dosage forms, *J. Pharm. Sci.*, **100**(4), 1228-1259 (2011). N.R. Rao, S.S.M. Kiram, N.L. Prasanthi, Pharmaceutical impurities: An overview, *Int. J. Pharm. Educ. Res.*, **44**(3), 1228-1259 (2010).

12. Cofepris. Norma oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, *Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos* [Internet]. México: Cofepris; 2015 [updated 2016 February 4]. URL: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5424575. consultado Marzo 2022.

13. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline Impurities in new drug products Q3B(R2). [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2006 [updated 2 June 2006]. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf, consultado Marzo 2022.

14. El termino metal pesado (heavy metal) está referido a la gravedad específica, peso atómico, numero atómico y propiedades químicas. Por ejemplo Plomo, Cadmio y Níquel son elementos químicos cuya gravedad específica es al menos cinco veces mayor que la gravedad especifica del agua. F. Nessa, S.A. Khan, K.Y.I. Abu Shawish, Lead, cadmium and nickel contents of some medicinal agents, *Indian J. Pharm. Sci.*, **78**(1), 111-119 (2016).

15. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for Elemental Impurities Q3D(R1). [Internet]. Switzerland: The internatio-

nal Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2019 [updated 22 March 2019]. URL: http://https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf, consultado Marzo 2022.

16. A. Teasdale, C.C. Chéry, G. Cook, J. Glennon, L. Harris, C.W. Lee, N. Lewen, P. Nethercote, S. Powell, H. Rockstroh, L. Rutter, L. Smallshaw, S. Thompson, V. Woodward, K. Ullman, Implementation of ICHQ3D Elemental impurities Guideline: Challenges and opportunities, *Pharm. Technol.*, **89**, 38-49 (2015).

17. A.K. Yadav, A review on research trend in corrosion resistant alloy (hastelloy), Lead, cadmium and nickel contents of some medicinal agents, *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng.*, **2**(4), 311 (2016).

18. Nickel Development Institute, A designer's handbook series. No 9014. Design guidelines for the selection and use of stainless steel. [Internet]. United States. URL: http://www.nickelinstitute.org/media/1667/designguidelinesforthese-lectionanduseofstainlesssteels_9014_.pdf, consultado Marzo 2022.

19. P. Eugen, M. Bolte, *Highly corrosion resistant enamel composition free from heavy metals for its production, use and coted bodies*, European patent. EP1231189b1, 4, 2011.

20. Water for pharmaceutical purposes. Chapter 1231. *United States Pharmacopea - National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. USP 41, NF 36, 1. 6145-6146, 2018.

21. Purified water General chapter 42. *United States Pharmacopea - National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. USP 41, NF 36, 1. 6145-6146, 2018.

22. D. Jenke, Materials in manufacturing and packaging systems as sources of elemental impurities in packaged drug products: an updated literature review, *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.*, **74**, 324-347 (2020).

23. D.R. Jenke, C.L.M. Stults, D.M. Paskiet, Materials in manufacturing and packaging systems as sources of elemental impurities in packaged drug products: literature review, *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.*, **69**, 1-48 (2015).

24. Heavy metals. General chapter 231. *United States Pharmacopea - National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. USP 41, NF 36, Volume 1; 6145-6146, 2018.

25. Elemental impurities limits. General chapter 232. Name. *United States Pharmacopea -National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. USP 41, NF 36, Volume 1, 6147-6150, 2018.

26. Elemental impurities procedures. General chapter 233. Name. *United States Pharmacopea -National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. USP 41, NF 36, Volume 1. 6151-6156, 2018.

27. R. Thomas, Determining elemental impurities in pharmaceuticals material: how to choose the right technique, *Spectroscopy*, **30**, 30-42 (2015).

28. Referencias generales acerca de esta técnica analítica: a) R. Thomas, *Measuring elemental impurities in pharmaceuticals a practical guide*, CRC Press Ed., Boca Raton (FL), 2018. b). C.B. Boss Fredeen, *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled Plasma Optical Emission spectrometry*, Perkin Elmer Ed., 2004**.**

29. R. Thomas, *Measuring elemental impurities in pharmaceuticals a practical guide*, CRC Press Ed., Boca Raton (FL), 2018.

30. M.F. Al-Hakkani, Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry "ICP-MS": Fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters, *SN Appl. Sci.*, **1**, 791 (2019).

31. O. Chahrour, J. Malone, M. Collins, V. Salmon, C. Greenan, A. Bombardier, Z. Ma, N. Dunwoody, Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 Active pharmaceutical ingredient (API) according to USP (232)/ (233), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **145**, 84-90 (2017).

32. P. Pohl, A. Bielawska-Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, M. Welna, *Trends. Anal. Chem*., **101**, 43-55 (2018).

33. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline Quality risk management Q9. [Internet]. Switzerland: The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; 2005 [updated 9 November 2005]. URL: http://database.ich.org/sites/default/files/Q9%20Guideline.pdf

34. A. Sharma, S.K. Jain, Elemental impurities in drug product, *Int. J. Pharm. Sci. Res*, **2**(2), 31-38 (2017).

35. K.B. Hansen, J. Balsells, S. Dreher, Y. Hsiao, M. Kubryk, M. Palucki, N. Rivera, D.D. Steinhuebel, J.D. Armstrong, D. Askin, E.J.J. Grabowski, First generation process for the preparation of the DPP-IV inhibitor Sitagliptin, *Org. Process. Res. Dev.*, **9**, 634-639 (2005).

36. A.A. Desai, Sitagliptin manufacture: A compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1974-1976 (2011).

37. S. Phillips, D. Holdsworth, P. Kauppinen, C. Mac Namara, Palladium impurity removal from active pharmaceutical ingredient process streams. A method for scale up, *Johnson Matthey Technol. Rev.*, **60**(4), 277-286 (2016).

38. G. Reginato, P. Sadler, R.D. Wilkes, Scaling up metal scavenging operations for pharmaceutical pilot plant manufactures, *Org. Process. Res. Dev.*, **15**, 1396-1405 (2011).

39. H.X. Ding, C.A. Leverett, R.E. Jr. Kyne, K.K.C. Liu, S.J. Fink, A.C. Flick, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to the 2013 new drugs, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 1895-1922 (2015).

40. A.C. Flick, H.X. Ding, C.A. Leverett, R.E. Jr. Kyne, K.K.C. Liu, S.J. Fink, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to the 2014 new drugs, *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 1937-1980 (2016).

41. A.C. Flick, H.X. Ding, C.A. Leverett, R.E. Kyne, Jr., K.K.C. Liu, S.J. Fink, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to new drugs approved during 2015, *J. Med. Chem.*, **60**, 6480-6515 (2017).

42. A.C. Flick, H.X. Ding, C.A. Leverett, S.J. Fink, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to new drugs approved during 2016, *J. Med. Chem.*, **61**, 7004-7031 (2018).

43. A.C. Flick, C.A. Leverett, H.X. Ding, E. McInturff, S.J. Fink, C.J. Helal, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to new drugs approved during 2017, *J. Med. Chem.*, **62**, 7340-7382 (2019).

44. A.C. Flick, C.A. Leverett, H.X. Ding, E. McInturff, S.J. Fink, C.J. Helal, J.C. DeForest, P.D. Morse, S. Mahapatra, C.J. O´Donnell, Synthetic approaches to new drugs approved during 2018, *J. Med. Chem.*, **63**, 10652-10704 (2020).

45. A.O. King, N. Yasuda, Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in the synthesis of pharmaceuticals, *Top. Organomet. Chem.*, **6**, 205-245 (2004). A.J. Burke, C.S. Marques, N. Turner, G.J. Hermann, *Active Pharmaceutical ingredient in Synthesis: Catalytic processes in research and development*, Wiley-VCH Eds., Germany, 2018.

46. C.E. Garret, K. Prasad, The art of meeting Palladium specifications in active pharmaceutical ingredients produced by Pd-catalyzed reactions, *Adv. Synth. Catal.*, **346**, 889-900 (2004).

47. H. Ren, C.A. Strulson, G. Humprey, R. Xiang, G. Li, D.R. Gauthier, K. Maloney, Potassium isopropyl xanthate (PIX): an ultra–efficient palladium scavenger, *Green Chem.*, **19**, 4002-4006 (2017).

48. . D. Chouiki, I. Kulai, D.E. Bergbreiter, M. Al-Hashimi, H.S. Bazzi, Functionalized polyisobutylene and liquid/liquid separations as a method for scavenging transition metals for homogeneously catalyzed reactions, *Appl. Sci.*, **9**, 120 (2019).

49. . J.C. Ortiz-Lara, A. Balderrábano-López, Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica, *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **48**(1), 18-42 (2017).

50. P.P. Mpungose, Z.P. Vundla, G.E.M. Maguire, H.B. Friedrich, The current status of heterogeneous Palladium catalyzed Heck and Suzuki Cross-Coupling reactions, *Molecules*, **23**, 1676 (2018).

51. R.A. Arancon, C.S.K. Lin, C. Vargas, R. Luque, To be or not to be metal-free: trend and advances in coupling chemistries, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 10-35 (2014).

52. X. Guo, S. Alavi, J. Mostaghimi, Analytical performance of the conical torch in axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **34**, 2126-2135 (2019).

53. V. Balaram, Recent advances and trends in inductively coupled plasma-mass spectroscopy and applications. Chromatography online. Special issues. May 01. 2018, 2. 8-13, 38, 2018. URL: http://www.chromatographyonline.com/recent-advances-and-trends-inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-and-applications, Consultado Marzo 2022.

54. B. Sauer, Y. Xiao, M. Zoontjes, C. Kroll, Application of X-ray fluorescence spectrometry for screening pharmaceutical products for elemental impurities according to ICH guideline Q3D, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **179**, 113005 (2020).

Cómo citar este artículo

J.C. Ortiz-Lara, M.Y. Salvitano-Domínguez, E. Mendez-Campos, P.V. Robles-Salgado, Impurezas elementales en las sustancias activas: una perspectiva general, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 11-58 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102095

Article of technological research / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103374*

Quality evaluation and dissolution profile of hydrochlorothiazide tablets available in Salvador-BA, Brazil

Cinara Vasconcelos da Silva[1]*, Paula Maiana Oliveira Ferreira[1], Matheus da Silva Ferreira[2], Amanda dos Santos Teles Cardoso[1], Valdinéa dos Santos Dias[1], Cleber Alberto Schmidt[1], Aníbal de Freitas Santos Júnior[2], Edith Cristina Laignier Cazedey[1]

[1]Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Ondina - 40170-115 - Salvador, BA – Brazil. Phone: + 55 (71) 32836973 Fax: +55 (71) 32836900.

[2]Departamento de Ciências da Vida, Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Bahia, Campus I, Rua Silveira Martins, 2555 – Cabula - 41000-150 - Salvador – BA – Brazil.

*Author for correspondence: cinarasilva@ufba.br

Received: July 1, 2022

Corrected: July 19, 2022

Accepted: July 26, 2022

Summary

Introduction: hydrochlorothiazide is a diuretic drug indicated for the continuous treatment of hypertension. The drug is presented as a medicine in the form of tablets containing only one active agent or combined in formulations with concentrations of 12.5, 25 and 50 mg. The 25 mg dosage is the most widely used in medical therapy. Therefore, considering the incidence of hypertension and prolonged use of the drug, it is necessary to determine the quality of hydrochlorothiazide tablets available on public and private pharmacies of Salvador, Bahia. Complaints regarding the compromised quality of the products stored in drugstores are reported very often. **Material and Methods:** following the drug monograph, and consequently the pharmacopoeial methods, this study aimed to carry out quality control, physicochemical and microbiological testing of medicines containing hydrochlorothiazide, including the trade name (reference – R), generic (G) and similar (S) medicine, which is provided by **National Health Service** (aka SUS – *Sistema Único de Saúde*). **Results:** it was observed that the samples of the medicines: R, G and S samples showed complies with the pharmacopoeial tests, except for the assay of generic which content presented out of specification.

Keywords: Hydrochlorothiazide; quality control; monograph; tablets.

Resumen

Evaluación de calidad y perfil de disolución de tabletas de hidroclorotiazida disponibles en Salvador-BA, Brazil

Introducción: la hidroclorotiazida es un fármaco diurético indicado para el tratamiento continuo de la hipertensión. El fármaco se presenta como medicamento en forma de pastillas que contienen un solo principio activo o combinados en formulaciones con concentraciones de 12,5, 25 y 50 mg. La dosis de 25 mg es la más utilizada en terapia médica. Por lo tanto, considerando la incidencia de hipertensión arterial y el uso prolongado del medicamento, es necesario determinar la calidad de las pastillas de hidroclorotiazida disponibles en las farmacias públicas y privadas de Salvador, Bahía. Las quejas sobre la calidad comprometida de los productos almacenados en las farmacias se informan con mucha frecuencia. **Material y Métodos:** siguiendo la monografía de medicamentos y, en consecuencia, los métodos de la farmacopea, este estudio tuvo como objetivo realizar controles de calidad, pruebas fisicoquímicas y microbiológicas de medicamentos que contienen hidroclorotiazida, incluido el nombre comercial (referencia - R), genérico (G) y medicamento similar (S), que es proporcionado por el Servicio Nacional de Salud (también conocido como SUS - Sistema Único de Saúde). **Resultados:** se observó que las muestras de los medicamentos: muestras R, G y S cumplieron con las pruebas de la farmacopea, excepto el ensayo de genéricos cuyo contenido presentó fuera de especificación.

Palabras clave: Hidroclorotiazida; control de calidad; monografía; pastillas.

Resumo

Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida disponíveis em Salvador-BA, Brasil

Introdução: a hidroclorotiazida é um fármaco diurético indicado para o tratamento contínuo da hipertensão. O fármaco se apresenta como medicamento em forma de comprimidos contendo um único princípio ativo ou combinados em formulações com concentrações de 12,5, 25 e 50 mg. A dose de 25 mg é a mais utilizada na terapia médica. Portanto, considerando a incidência de hipertensão arterial e o uso prolongado do medicamento, é necessário determinar a qualidade dos comprimidos de hidroclorotiazida disponíveis nas farmácias públicas e privadas de Salvador, Bahia. Reclamações sobre a qualidade comprometida dos produtos

armazenados nas farmácias são muito frequentes. **Material e Métodos:** seguindo a monografia do medicamento e, consequentemente, os métodos da farmacopeia, este estudo teve como objetivo realizar o controle de qualidade, testes físico-químicos e microbiológicos de medicamentos contendo hidroclorotiazida, incluindo o medicamento comercial (referência - R), genérico (G) e similar (S), que é fornecido pelo Serviço Nacional de Saúde (também conhecido como SUS - Sistema Único de Saúde). **Resultados:** observou-se que as amostras de medicamentos: amostras R, G e S atenderam aos testes de farmacopeia, exceto o teste do genérico cujo conteúdo estava fora da especificação.

Palavras-chave: Hidroclorotiazida; controle de qualidade; monografia; comprimidos.

Introduction

Systemic Arterial hypertension (SAH) is a chronic disease and a multifactorial clinical condition. SAH is characterized by sustained elevation of blood pressure (≥ 140 and 90 mmHg). It is often associated with metabolic disorders, functional and/or structural alterations of target organs, and it is aggravated by the presence of other risk factors such as dyslipidemia, obesity, glucose intolerance and diabetes [1].

Data from the World Health Organization (WHO) indicates there are about 1.13 billion people worldwide with hypertension [2]. In Brazil, it is estimated that the pathology affects 23.9%, corresponding to 38.1 million people [3], besides being more than 65% of the elderly (≥ 60yo) in the country [1].

SAH is a major cause of premature death worldwide, with upwards of 1 in 4 men and 1 in 5 women [2]. In Brazil, around 389 thousand people die daily due to hypertension [4].

One of the drugs of first choice for the treatment of SAH, heart failure and edema of a variety of etiologies is hydrochlorothiazide (HCTZ) [1]. This drug is a moderate-acting diuretic, acting on the initial portion of the distal tubule, blocking sodium, chlorine and water reabsorption [5].

HCTZ, chemically known as 2*H*-1,2,4-Benzothiadiazine-7-sulfonamide, 6-chloro-3,4-dihydro-, 1,1-dioxide; 6-Chloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine-7- sulfonamide 1,1-dioxide, is a white or almost white, crystalline powder (Figure 1). It presents molecular formula $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, Chemical Abstracts Service (CAS) registry number [58-93-5] and relative molecular mass equal to 297.7. HCTZ is very

slightly soluble in water, soluble in acetone, sparingly soluble in ethanol (96 per cent). It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides and it shows polymorphism [6-8].

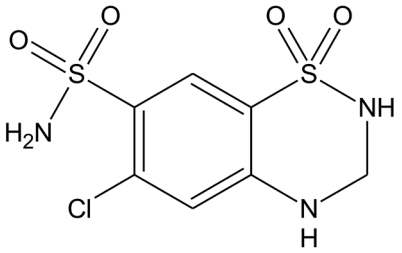


Figure 1. Hydrochlorothiazide chemical structure

This drug is listed in the National List of Essential Drugs (RENAME), in the concentrations of 12.5 mg and 25 mg [9] and it is part of the drugs that must be offered continuously to the **National Health Service [10]**. Commercially, HCTZ is available as uncoated tablets. The medicine is found in Brazilian market at concentrations of 50 mg, 25 mg and 12.5 mg and it may be associated with other drugs.

HCTZ tablets have good oral bioavailability (65 to 75%), with an onset of effect between 1 and 2 hours after administration, peaks in about 4 hours and lasts about 6 to 12 hours; the excretion is urinary [11].

Many factors can compromise the quality of medicines, such as the use of improper-quality of raw material and/or packaging material, the use of irregular manufacturing processes, and factors that may affect its storage and transport stability. In this context, to prevent possible deviations, quality control tests are mandatory.

The objective of this study was to evaluate the quality of hydrochlorothiazide 25 mg tablets obtained in Salvador-BA, in order to verify if the conditions of identity, content, purity, efficacy and harmlessness were attended and maintained in the post-commercialization.

Material and Methods

The reference standard was a Pharmaceutical Secondary Standard (PSS), HCTZ, batch no. C01-20101011, with 100.1% content, kindly provided by NCQ-UNIFAL-MG. The samples of HCTZ uncoated tablets, 25 mg (label claim), were identified as R (reference), G (generic) and S (similar medicine) (n=90 units each). All HCTZ tablets were acquired in commercial and public pharmacies in Salvador-Bahia, in 2018. For ethical reasons, the names of the medicine manufacturers were not informed.

According to the medicine leaflets, in addition to hydrochlorothiazide, R was composed by lactose monohydrate, corn starch, pregelatinized corn starch and magnesium stearate; G by lactose monohydrate, corn starch, pregelatinized corn starch and magnesium stearate; and S were constituted by sodium lauryl sulfate, sodium croscarmellose, sodium starch glycolate, lactose, microcrystalline cellulose, stearate magnesium and silicon dioxide.

The experimental design of this research was carried out with the samples within the expiration date and based on the monographs of HCTZ active pharmaceutical ingredient (API) and/or tablets, from the Brazilian [6], European [7] and American [8] Pharmacopoeias.

All solvents were at least analytical grade, and the following were used: purified water, sodium hydroxide - NaOH (Neon), culture media (Isofar) - *Soybean Casein* Digest *Broth* (TSB), Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar - TSA), Sabouraud-Dextrose Agar (SDA), MacConkey Agar, Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Bismuth Sulfite (BS) Agar, Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA), Cetrimide Agar and Rappaport Vassiliadis Salmonella (RVS) Enrichment Broth (Merck). To biochemical characterization were used Triple Sugar Iron (TSI) Agar; Simmons' Citrate Agar; Sulfur, Indole and Motility (SIM) Agar and Methyl Red (MR) test.

The equipments used were analytical balance (Ohaus, Explorer model), ultrasound (Cristófoli), disintegrator (Nova Ética, model 300), UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu, model UV-1800), dissolution tests system (Nova Ética, model 300-1).

Standard Solution: Amount of 30.0 mg of HCTZ PSS were weighted and dissolved in 50 mL of 0.1 M sodium hydroxide. Posterior dilutions were performed with water as solvent.

Test Solution: Twenty tablets of each HCTZ sample (R, G and S) were weighed and pulverized. Amount equivalent to 30.0 mg were dissolved in 50 mL of 0.1 M sodium hydroxide and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Test solutions were homogenized and filtered. Posterior dilutions were performed with water as solvent.

Identification by UV absorption spectrophotometry: identification tests were performed as described in the individual HCTZ API monographs [6, 8]. The samples were compared to PSS and also evaluated in spectral range from 250 to 350 nm. The HCTZ tablets complies with the test if similar spectra pattern are obtained and/or absorption maxima at 273 nm and 323 nm are found with absorbance ratio (A273/A323) equal 5.4 to 5.7.

Weight determination: Twenty HCTZ tablets were used. Each unit was weighed on analytical balance, and the mean weight was then calculated. To the specification of this test, up to two out-of-range units were tolerated in relation to the mean weight, and no unit could be above or below twice the percentages indicated [6, 8-12].

Hardness test: Ten units of each sample (R, G, S) were submitted to the equipment and the force needed to disrupt them by crushing were measured. All results were expressed in newtons (N).

Friability test: Twenty HCTZ tablets were carefully dedusted prior to testing. The samples were accurately weighed and placed in a friabilometer drum. The drum was than rotated 100 times (25 rpm/min), and after all, removed the tablets. Removing any loose dust from the tablets as before, the tablets were again accurately weighed. Friability are represented by the difference between tablets initial mass and final one. HCTZ tablets with a loss of less than 1.5% weight are considered acceptable. If cracked, cleaved, or broken tablets are present in the tablet sample after tumbling, the samples fail the test [6]. A maximum loss of mass (obtained from a single test or from the mean of 3 tests) not greater than 1.5 per cent is considered acceptable for most products.

Disintegration tests: Six HCTZ tablets were placed in each 6 tube of the basket-rack assembly. The immersion fluid was water, maintained at 37 °C ± 1 °C in 1-liter beaker. The equipment was activated up to complete tablets disintegration, with a specified time limit of 30 minutes. The requirements of the test are met if all dosage units tested have disintegrated [6, 8-12].

Uniformity of dosage units: Content uniformity was determined by analyzing the individual amount of the active substance in 10 HCTZ tablets taken at random. The evaluation were performed by spectrophotometric assay in concentration of 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$, at the wavelength of 273 nm, using 0.1 M NaOH and water as solvent. The value of acceptance was calculated [6, 8]. The pharmaceutical product complies Uniformity of dosage test if the Acceptance Value calculated for the 10 units tested is not greater than L1 (L1 = 15.0).

Dissolution Studies: Dissolution testing was performed using apparatus 1 (basket) at rate of 100 rpm and 900 mL of 0.1 M hydrochloric acid (HCl) (dissolution medium). The medium was kept at temperature of 37 ± 0.5 °C [6, 8]. Aliquots of 10.0 mL were manually sampled at 30 minutes [6]. In addition, dissolution profiles were obtained: aliquots of 10.0 mL were removed at 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes. In the study with multiple sampling times, the aliquots withdrawn were replaced with equal volumes of fresh dissolution medium at 37 °C ± 0.5 °C. The collected aliquots were filtered and transferred to amber vials for subsequent evaluation by UV spectrophotometry

at a wavelength of 272 nm, using 0.1 M HCl as solvent [6, 8]. The absorbance values were converted to concentrations by comparison to PSS values. The percentage of HCTZ released by time were also calculated considering the amount of drug removed in each aliquot and the dilution caused by the replacement of dissolution medium in dissolution profile studies. The requirements are met if not less than 60% (Q) of the labeled amount of hydrochlorothiazide ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$) is dissolved in 30 minutes [6].

Microbiological Examination of Non-Sterile Products

All microbiological tests were carried out under aseptic conditions designed to avoid extrinsic microbial contamination of the HCTZ product.

Microbial enumeration test (Total Aerobic Microbial Count – TAMC and Total Combined Yeasts/Moulds Count - TYMC): the estimative number of viable microorganisms were performed by plate count method. .From each sample - R, G and S, the equivalent of 5 g of HCTZ were weighed and transferred to erlenmeyer containing 45 mL of TSB (1:10). After 10 minutes homogenization, 1 mL of the suspension were placed into a set of 4 sterile Petri dishes. Then, 15 mL of TSA and SDA were added in duplicate in the dishes. The TSA plates were incubated at 30-35 °C for 2 days and plates containing SDA were maintained at 20-25 °C for 7 days [6, 8-12]. After incubation, the arithmetic mean per culture medium of the counts were evaluated and the number of colonies forming units (CFU) per gram of HCTZ per sample were calculated. Only plates with less than 250 for TAMC and 50 for TYMC were considered. Samples comply with the test if they present a maximum of 10^3 CFU/g for aerobic bacteria and 10^2 CFU/g for yeasts/mould [6, 8-12].

Test for Specified Microorganisms: in order to better understand the microorganisms that can contaminate pharmaceutical forms and trigger health problems were performed tests for *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [6, 8-12]. The first phase of the test was carried out in a 1:10 dilution non-selective enrichment, performed from the same suspension previous described in TSB, mixed and incubated at 30-35 °C for 24h. The second phase, selective, was performed as described below for each pathogen:

Escherichia coli - from non-selective enrichment, an aliquot of 0.1 mL was taken and transferred to 10 mL of MacConkey Broth and incubated at 42-44 °C for 24 hours. Subculture for pathogen isolation and selection was performed by streaking technique in MacConkey Agar, followed by incubation at 30-35 °C for 24 hours.

Salmonella sp. - after sample preparation and pre-incubation, were transferred 0.1 mL of TSB to 10 mL of RVS and incubated at 30-35 °C for 24 h. Subculture for isolation

and selection was carried out on plates containing XLD Agar, and BS Agar incubated at 30-35 °C for 24 hours.

Pseudomonas aeruginosa - from first phase was inoculated by surface streaking method a suitable amount on a plate of Cetrimide Agar and incubated at 30-35 °C for 24 hours.

Staphylococcus aureus - from sample preparation and pre-incubation, subculture was proceeded for isolation and selection. It was performed on a plate of mannitol salt agar and incubated at 30-35 °C for 24 hours. For interpretation: the presence of growth of colonies leads to identification tests by their typical morphological aspect. In this case, a set of biochemical tests are carried out for each pathogen. Pharmacopoeia stat the product complies with the test if no colonies are present or if the identification tests are negative [6, 8-12].

Biochemical Identification Tests were performed according to Brazilian [6], European [12] and American [8] pharmacopoeias, using TSI; Simmons' Citrate and SIM Agars and MR test.

Assay: The powder amount equivalent to 15 mg of HCTZ was weighed from crushed tablets and solubilized in 0.1 M NaOH with final concentration of 300 $\mu g \cdot mL^{-1}$. This solution was homogenized, filtered and diluted with water to a concentration of 10.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$. A further evaluation of PSS solutions was also performed at concentration of 10.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$. All evaluations were carried out in triplicate, measuring solutions absorbance at 273 nm. Water was used for zero adjustment. The drug content was calculated comparing the results, as specified by the Brazilian Pharmacopoeia [6]. The Brazilian Pharmacopoeia the specification for this test is at least 93.0% and at most 107.0% of the declared amount of HCTZ [6]. In United States Pharmacopoeia HCTZ tablets should contain not less than 90.0% and not more than 110.0% of the labeled amount of $C_7H_8ClN_3O_4S_2$.

Results and discussion

Tablets are solid preparations representing more than 80% of all pharmaceutical forms used currently [13]. They are obtained by compressing uniform volumes of particles or by another suitable manufacturing technique, and are intended for oral administration.

In the manufacture of tablets, evaluations are accomplished to ensure they possess a suitable quality. However, problems in the packaging, storage and distribution of tablets may happen. Despite this, post-commercialization tests are rare. Therefore, appropriated evaluations should be taken to assess the quality and its maintenance.

The HCTZ tablets were subjected to physical-chemical and microbiological tests to identification; weight determination, friability, disintegration, uniformity of dosage units; dissolution; microbial enumeration and specified microorganisms research; and assay. For each sample: reference, generic and similar, the following results were obtained.

The HCTZ tablets evaluated in this study were all white, straight and solid cylinders. The end surfaces of which tablet were flat and the edges were beveled. They have break-marks in one side and were uncoated tablets with diameters of 7.0 mm.

Besides to these non-pharmacopoeial characteristics, identification tests were performed. Spectra obtained from the three HCTZ samples followed same spectral pattern of PSS, with absorbance ranging in UV region and maximum absorption at 273 and 323 nm, as specified, allowing confirmation of the HCTZ presence in the R, G and S drug tablets (Figure 2). Additionally, absorbance ratios were calculated and the results shown average value equal to 5.4.

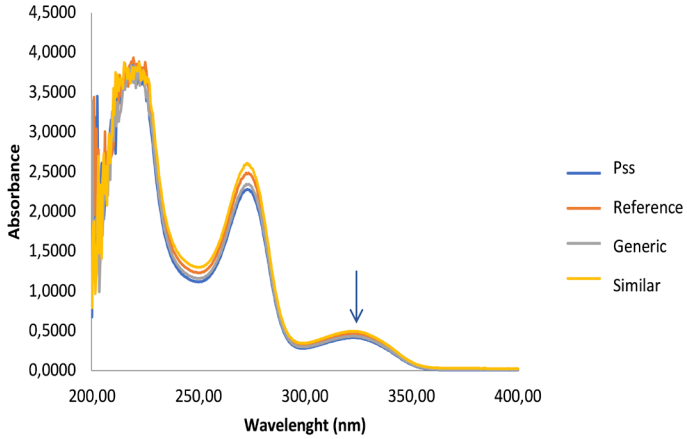


Figure 2. Spectra overlap of HCTZ PSS and samples

Regarding weight determination, all bath samples evaluated presented the mean weight within the acceptable range established by Pharmacopoeias (7.5%) [6, 8-12]. For the R medicine, the average weight determined was 110.1 mg, with a relative standard deviation (RSD) of 1.54%. For G tablets the average weight was 122.4 mg with RSD of 1.99%. For S units the average weight was 122.5 mg with 1.26% RSD (Figure). From the results, it can also be said that there was a good mass uniformity in the tablets, as the relative standard deviation (RSD) was low (less than 2.0%) for all samples.

Weight determination is a simple test but with significant importance for quality control. Since tablet mass and active ingredient amount are directly proportional, very large variations in weight may lead to incorrect doses. Consequently, it may promote absence of expected therapeutic action, in case of lower dosage, and side effects and overdose, in case of higher dosage [14]. Likewise, it is important to observe the minimum variation between the tablets weight. This criteria represents homogeneity of manufacturing. As in the case of this work the samples analyzed remained within the limits and presented relative standard deviations very low. However, the isolated study of this parameter is not indicative of dose regularity between the tablets and, for this purpose, the unit dose uniformity test has to be performed.

The mechanical strength of tablets can be assessed in two main ways, hardness (resistance to crushing of tablets or tablet breaking force) and friability, since this pharmaceutical form must present a certain resistance to not break, crack or detach powders during production, storage and/or transportation [6, 15].

The results obtained by resistance to crushing of tablets were 101.2; 34.0 and 83.5 N, respectively, from R, G and S HCTZ tablets. Although tablet breaking force is an informational test, the results presented the mean minimum value of the force needed to crush each sample.

Friability test is a measurement of tablet friability. It is a supplementary test to assess physical strength of medicine, usually analyzed together with tablet breaking force [12]. The friability is a test that observes particles detachment of product, allowing to determine the resistance of the tablets to abrasion, when subjected to the mechanical action of specific apparatus [6]. This test is fundamental during the production process, as it allows the necessary adjustments to ensure a good tablet cohesion.

By analyzing the data obtained in the present research, it can be observed that the mass loss after the test were 0.28% for R, 0.05% for G and 0.06% for S tablets. Although the mass loss of the reference drug is higher than other samples, the percentage remains within the acceptable upper limit of 1.5% [6]. So the results founded corroborate the adequate manufacture of the tablets under analysis.

Disintegration test is provided to determine whether tablets disintegrate within the prescribed time when placed in a liquid medium under the experimental conditions [12]. It is, therefore, a time-dependent process that occurs under the action of a disintegrating agent [13].

For the purposes of this test, disintegration does not imply complete dissolution of the unit or even of its active constituent. Complete disintegration is defined as that state

in which any residue of the unit remaining on the screen of the test apparatus is a soft mass having no palpably firm core [6, 12].

In cases where disintegration does not occur within the specified maximum time of 30 min for HCTZ tablets [6, 16], there is a risk that the unit will be disposed of unchanged, without absorption of the active ingredient and therefore without expected therapeutic effect.

In this study, R samples were disintegrated in 1 min 28 s, G in 7 min 29 s and S in 1 min 12 s. It can be observed that all samples complied the requirement disintegrating in less than 30 minutes. However, the generic drug presented a time of 7 min 29 s, while the other two samples are below 1 min 30 s. Once R and G presents qualitatively the same excipients, may the compression force have used influenced these tablets disintegration.

Uniformity of dosage units was performed by uniformity of content of single-dose preparations, based on the assay of the individual contents of HCTZ in ten units. It was determined whether the individual contents were within limits set with reference to the average content of the sample [6, 12].

The values found (Table 1) were then replaced in the formula: $AV = |98.5 - \bar{X}| + ks$, for the Acceptance Value (AV) calculation, wherein: $\overline{X}$ corresponds to the average of the individual contents of 10 tablets; K is the acceptability constant equal to 2.4 (n=10); and S is the standard deviation of dosing [6]. Performing the calculations, the AV were 10.1 for R, 15.0 for G and 12.3 for S HCTZ samples. Thus, despite the borderline value for G tablets all samples passed the test.

Table 1. Results from Uniformity of dosage units

	ASSAY – CONTENT (%)		
Tablet #	**Reference (R)**	**Generic (G)**	**Similar (S)**
1	96.52	88.91	90.92
2	91.98	87.39	94.75
3	91.59	89.75	93.65
4	96.33	86.21	98.39
5	99.09	87.05	93.29
6	94.94	85.87	96.93
7	95.93	88.23	95.84
8	96.72	91.78	87.28
9	96.13	91.44	93.11
10	90.40	91.44	93.11
Average	94.96	88.81	93.11

(*Continúa*)

	ASSAY – CONTENT (%)		
Tablet #	**Reference (R)**	**Generic (G)**	**Similar (S)**
RSD (%)	2,89	2,50	3,33
s	2,74	2,22	3,13
AV	10.1	15.0	12.3

From a clinical point of view, it is important for therapy that the variation between the doses present in the medicines keep minimal, since the lack of uniformity may lead to incorrect bioavailability and, consequently, to therapeutic failure or exacerbation of effects.

Dissolution tests is provided to determine compliance with the dissolution requirements for solid dosage forms administered orally. The Brazilian [6] and United States [8] Pharmacopoeias recommend that not less than 60% (Q) of the labeled amount of HCTZ must be dissolved within 30 and 60 minutes, respectively. Since the percentages released in these two times were 90.04 and 99.05 for R, 93.46 and 99.00 for G and 82.31 and 95.23 for S, all samples comply the official compendia recommendations.

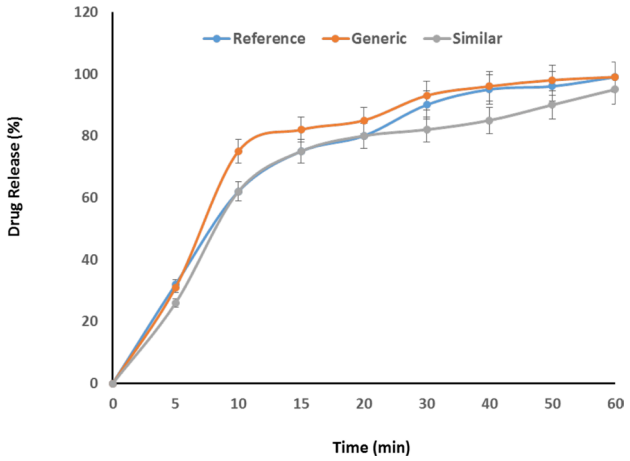


Figure 3. Dissolution profiles of HCTZ tablets.

On the other hand, as can be seen in Figure 3, the levels (the mean values ± standard deviations) of HCTZ in the dissolution medium for R, G and S samples multipoint analysis followed different patterns. Between 5 and 30 minutes, the G sample showed greater HCTZ release. After 30 min, the dissolution profiles of R and G tablets superimposed, indicating similar dissolution up to the end of the test. S tablets presented analogous dissolution profile of R, until 20 minutes, after that the HCTZ release was lower than those observed for the other samples, but still adequate, considering therapeutics purpose.

Clearly, the dissolution profile reveals the quality of medicines in a broader sense, giving evidence of their bioavailability. In fact, since hydrochlorothiazide is very poorly soluble in water, technological problems or those related to the formulation can compromise the dissolution profile and, consequently, the bioavailability, thereby the study of dissolution is essential.

WMicrobiological tests are an important part of quality control evaluation many times suppressed for non-sterile pharmaceutical products. However, microbiological contamination frequently changes pharmaceutical product quality, in addition to may interfere in its stability, which consequently creates problems in drug therapy. Moreover, microbial interference may transform APIs and excipients to less or more potent or chemically inactive forms. So, contamination by microorganisms, mainly at the storage and distribution stages may hinder the consumer safety [6, 17].

All data, achieved by means of compendial microbiological and biochemical analyses as described in the methods, have been analyzed in context to the recommended microbial limits and the user safety.

The microbial enumeration test allow quantitative register of mesophilic bacteria and fungi that may grow under aerobic conditions. It are designed primarily to determine whether HCTZ tablets samples complies with the established specification for non-sterile pharmaceutical products.

Count the number of total microorganisms - after the incubation period, the CFU were verified. Growth was observed for the three samples analyzed. All HCTZ samples grew within the limits established of 1000 CFU/g for total aerobic bacteria and 100 CFU/g for molds and yeasts [6, 8-12], however, it was observed that G sample presented the highest and borderline average of contamination molds and yeasts (100 CFU/g), which may cause risks to the product and patients, once it may compromise its physical-chemical stability and facilitate infections and health problems [18].

To identify specified microorganisms the samples were streaked on surface of selective media for selection and isolation of *E. coli*, *Salmonella sp*., *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

In the inoculations performed on Cetrimide Agar to identify the presence of *P. aeruginosa*, only S sample showed bacterial growth in selection and isolation phases (Figures 5A and 5C), but none of the positivity characteristics for this bacterium could be observed. According to Brown and Lowbury [19], the growth on Cetrimide Agar is considered positive for *P. aeruginosa* when it is possible to observe colony with blue pigmentation, characteristic of the pyocyanin production, or blue-green pigmentation surrounding the colonies, indicative of the production of fluorescein or both pigments.

Subsequent biochemical tests were performed on isolated colonies. Negative results from Cetrimide Agar with R sample were observed.

The selection and isolation of *E. coli* on MacConkey Agar for S and R samples showed intense growth of rounded and reddish colonies, indicating the probable presence of this microorganism in those medicaments. The colonies were further submitted to biochemical tests for confirmation.

The G HCTZ sample showed no growth on Cetrimide and MacConkey Agar, which allows to conclude that *P. aeruginosa* and *E. coli* were absent in these medicines.

Regarding the tests performed to investigate the presence of Salmonella sp. no growth was observed by the analyzed samples, on both XLD and BS Agar.

In the research for *S. aureus* on MSA, G sample presented not only growth, but also a very characteristic aspects of this pathogen - unctuous yellow colonies and changed the color of agar, which switched from red to yellow [19]. The reason for this color change is that *S. aureus* has the ability to ferment mannitol, producing an acid, which changes the indicator color [6, 20].

Biochemical identification tests were carried out with the objective to increase efficient microbiological control and improve assurance for the quality of pharmaceutical products [12]. It were carried out on TSI Agar; on Simmons' Citrate Agar; SIM Agar and by MR test.

Biochemical characterization of an unknown microorganism is the classical approach to identification [12] and were performed on all colonies isolated from HCTZ R, G and S samples. The results obtained are shown in Table 2.

The negative results from indole (SIM) and MR for the suspected colonies of *E. coli* exclude their presence in the samples analyzed in this work. The tests performed on the HCTZ S sample show the probable presence of fermenter microorganisms of the genera *Enterobacter* or *Serratia*, while the reactions to the reference drug did not allow identifying the probable genus.

From the suspicious growth of *S. aureus* in the HCTZ G sample, the coagulase test was performed, which was negative, discarding the presence of *S. aureus* in this sample.

Although all samples have complied the specifications determined by the Pharmacopoeias [6, 8-12], the presence of microorganisms in drugs, even below pharmacopoeial limits, is extremely undesirable. Viable microorganisms can promote the formulation degradation through their enzymes or even noticeable changes that can cause infec-

Table 2. Results from biochemical tests

Samples	Media					
	TSI	Simmons' Citrate	SIM			MR
			S	I	M	
S from MacConkey Agar	+ growth, +gas, acid reaction throughout the medium	+	-	-	+	-
R from MacConkey agar	+growth, - gas, acid reaction at base and alkaline on sloping surface	-	-	-	+	-
S from Cetrimide Agar	+growth, + gas, acid reaction at base and alkaline on sloping surface	+	-	-	+	-

Legend: TSI: Triple Sugar Iron Agar; Sulfur, Indole and Motility (SIM) Agar and Methyl Red (MR) test; +: positive result; -: negative result.

tious processes in patients with compromised immune system, elderly and children [21]. Therefore, it can be stated that the efficacy and safety of medicines are directly related to their physicochemical and microbiological quality.

Assay - HCTZ was measured in the tablets samples by UV spectrophotometric method, at 273 nm, using 0.1 M NaOH and water as solvents. Despite the pharmacopoeial indication that assays should be performed in concentration of 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$, in practice (Table 3), it was observed that this concentration is at the limit of Lambert-Beer Law and would not guarantee the correct correlation between absorbance and content [22].

Table 3. PSS concentrations and absorbances obtained.

Concentration (μg·mL-1)	Absorbance
1	0.057
5	0.278
10	0.594
15	0.826
20	1.120

Thus, a working concentration of 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ was used to perform the assay. The samples were evaluated in triplicate and the following absorbance values were obtained (Table 4).

Table 4. Results from assay of R, G and S samples

Sample	R	G	S	PSS
Absorbance	0.583	0.515	0.561	0.589
	0.588	0.510	0.546	0.597
	0.586	0.532	0.563	0.594
Average	0.586	0.519	0.557	0.593
RSD (%)	0.35	1.81	1.36	0.56
Content (%)	98.81	87.56	93.91	100.1

Legend: R: reference; G: generic; S: similar sample; PSS: Pharmaceutical secondary standard; RSD: relative standard deviation.

The Brazilian Pharmacopoeia (2019) [8] establishes a minimum of 93.0% and a maximum of 107.0% of the declared quantity of HCTZ. The following assay results were found: 98.81% for R samples, 87.56% for G medicines and 93.91% for S tablets. Generic samples were the below stated by the Brazilian Pharmacopeia, and the results still remains without acceptable limits when evaluated by the US Pharmacopoeia [16], that established a range of 90.0 to 110.0%.

Analyzing the dosing values obtained by the unit dose uniformity test, Table 1, which followed the same analytical procedure, it can be observed that even with slightly higher average, 88.8% content, none of the assayed tablets from G samples has reached the minimum limit set for the content. Thus, the assays found in the unit dose uniformity test match the results found in this test and disapprove the generic drug for its content.

Stability tests should be additionally made to evaluate loss of HCTZ active substance in the storage and distribution stages. To make that possible, stability indicating analytical method should be developed and validated to fully assess the quality of HCTZ tablets.

Conclusions

In this work, results obtained from quality control methods for pharmaceutical application in HCTZ tablets were described. For each method, the basic principle was stated and the methods were discussed along with any critical aspects to be considered. Potential uses that may be envisaged based on the principles of the methods concerned were given, but it is not intended to suggest that such applications have been exhaustive contemplated.

It is the intention of this paper to give a general vision of the importance of quality evaluation in pos-commercial to guarantee pharmaceutical quality control.

The information herein may be used, therefore, as an alert for health managers, in the sense of the importance of maintaining the ideal conditions of storage and transport, as well as for the population, so that they keep up the proper conditions of conditioning.

Also, this paper this article draws attention to the need for development and validation stability indicative analytical methods for monitoring the quality of HCTZ tablets.

According to the results obtained it can be concluded that all samples analyzed have the active ingredient hydrochlorothiazide. In general, all the samples presented good performance in the physical-chemical tests, with approval in the tests of weight determination, uniformity of dosage units, friability and disintegration. However, the assay of Generic tablets showed a non-compliance, presenting a content below that recommended by the Pharmacopoeias.

For the microbiological tests, it was observed that all samples had UFC/g count within the established limits for aerobic bacteria and molds and yeasts. Regarding the tests carried out to investigate pathogenic microorganisms, despite the growth of Reference and Similar samples in MacConkey media, biochemical tests excluded the presence of *Escherichia coli* and indicated the presence of microorganisms of the genus *Enterobacter* or *Serratia* for the Similar drug.

Quality control is an important health promotion tool. The conducting tests during and after the production and marketing process is essential to ensure that medicinal products have and maintain the characteristics necessary to ensure their safety and effectiveness. Quality evaluations of drugs, such as the one carried out in this study, corroborate in this field since they are carried out without conflicts of interest.

Finally, this work demonstrates the relevance of Quality Control, because the medicines containing hydrochlorothiazide available on the market comply (in part) with pharmacopoeial requirements to safely and effectively.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. W.K.S. Barroso, C.I.S. Rodrigues, L.A. Bortollo, M.A.M. Gomes, A.A. Brandão, A.D.M. Feitosa, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020, *Arq. Bras. Cardiol.*, **116**(3), 516-658 (2020).

2. D.C. Mata, R.P.F. Gonçalves, I.E. Machado, M.I.F. Freitas, C. Azeredo, C.L. Szwarcwald. Prevalência da hipertensão arterial segundo os diferentes critérios diagnósticos, Pesquisa Nacional de saúde, *Rev. Bras. Epidemiol.*, **21**(SUPPL 1), E180021.supl.1, 1-15 (2018).

3. Pesquisa Nacional de Saúde - IBGE, *Informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde*, IBGE, Rio de Janeiro, 2020.

4. WHO, World Health Organization, Hypertension. URL: https://www.who.int/health-topics/hypertension#tab=tab_1. Acessed on May 17, 2020.

5. L.L. Brunton, B.A. Chabner, B.C. Knollmann, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*, McGraw-Hill Medical, New York, 2012.

6. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 6ª edição. ANVISA, Brasília, 2019.

7. Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 10 th Edition. Council of Europe, Strasbourg, Vol. II, 2019.

8. United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopeia - National Formulary*, Rockville, 2020.

9. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)*, Ministério da Saúde, Brasília, 2020.

10. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)*, Ministério da Saúde, Brasília, 2022.

11. Hydrochlorothiazide Tablets, USP [package insert]. Mylan Pharmaceuticals Inc., Morgantown, 2011.

12. Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 10 th Edition. Council of Europe, Strasbourg, Vol. I, 2019.

13. D. Markl, J.A. Zeitler, A review of disintegration mechanisms and measurement techniques, *Pharm. Res.*, **34**(5), 890-917 (2017).

14. L. Lachman, H. Lieberman, J.L. Kanig, *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon, 2001.

15. L.N. Prista, A.C. Alves, R. Morgado, *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon, Vol. II, 1990.

16. United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopeia*, USP-NF. <724> Drug Release. In: United States Pharmacopeia Convention, 2020. URL: https://latam-edu.usp.org/wp-content/uploads/2021/08/724.pdf. Acessed on May 21, 2022.

17. R. Noor, N. Zerin, K.K. Das, Microbiological quality of pharmaceutical products in Bangladesh: Current research perspective, *Asian Pacific J. Trop. Dis*., **5**(4), 264-270 (2015).

18. M. Ratajczak, M.M. Kubicka, D. Kamińska, P. Sawicka, J. Długaszewska, Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products, *Saudi Pharm. J.*, **23**(3), 303-307 (2015).

19. V.I. Brown, E.J.L. Lowbury, Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Phatol.*, **18**(6), 752-756 (1965).

20. G.W. Procop, D.L. Church, G.S. Hall, W.M. Janda, E.W. Koneman, P.C. Schreckenberger, G.L. Woods, *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*, 7ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2018.

21. T.J.A. Pinto, T.M. Kaneko, M.T. Ohara, *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, 3ª Edição, Atheneu Editora, São Paulo, 2010.

22. G.H. Ayres, Evaluation of accuracy in photometric analysis, *Anal. Chem*., **21**(6), 652-657 (1949).

How to cite this article

C. Vasconcelos da Silva, P.M. Oliveira-Ferreira, M.d.S. Ferreira, A.d.S. Teles-Cardoso, V.d.S. Dias, C.A. Schmidt, A.d.F. Santos Júnior, E.C. Laignier-Cazedey, Quality evaluation and dissolution profile of hydrochlorothiazide tablets available in Salvador-BA, Brazil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*., **52**(1), 59-77 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103374

Artículo de investigación clínica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109363*

Medición del consumo de antibióticos en unidades neonatales de tres instituciones de alto nivel de complejidad en Antioquia, Colombia

Laura Milena Rendón[1,2a*], Esteban Agudelo[1b], Adriana Milena Echavarría[3c], Santiago Atehortúa[4,5d]

[1] Servicio de Vigilancia Farmacológica, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, Medellín, Antioquia, Colombia.

[2] Laboratorio Integrado de Medicina Especializada (LIME), Medellín, Antioquia, Colombia.

[3] Servicio farmacéutico, Hospital General de Medellín Luz Castro de Gutierrez ESE, Medellín, Antioquia, Colombia.

[4] Servicio de epidemiologia, Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín, Antioquia, Colombia.

[5] Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Antioquia, Colombia.

* Autor correspondiente

Correos electrónicos:[a] laura.rendon@sanvicentefundacion.com,[a] laura.rendon@udea.edu.co,[b] esteban.agudelo@sanvicentefundacion.com,[c] aechavarria@hgm.gov.co,[d] satehortuamd@gmail.com

Recibido: 22 de junio de 2022

Revisado: 31 de julio de 2022

Aceptado: 6 de agosto de 2022

Resumen

Introducción: medir consumo de medicamentos es una estrategia para lograr un uso racional, pero implementarlo en pediatría es complejo. **Objetivo**: proponer una herramienta que facilite medir consumo de medicamentos en neonatos. **Materiales y métodos:** se extrajo cada mes del 2018 en neonatos, el consumo de 6 antibióticos para tres instituciones. Se validó y graficó la duración de tratamiento**. Resultados:** se demostró con $R^2>0,8$, Syx<15 y R.pearson>0,8, correlación para cada institución, entre cálculo por duración de tratamiento y dosis diaria definida; además con P>0,05 en pendiente e intercepto, se estableció que una línea predijo el comportamiento de las tres instituciones. **Conclusión**: el consumo de medicamentos por duración de tratamiento en neonatos, es útil para comparar medicamentos y evaluar el impacto de intervenciones clínicas.

Palabras clave: Antibacterianos, farmacorresistencia microbiana, pediatría, servicios de salud.

Summary

Measurement of the consumption of antibiotics in neonatal units of three institutions of high level of complexity in Antioquia, Colombia

Introduction: to measure the consumption of drugs is a strategy to achieve a rational use but implementing it in the pediatric service is difficult. **AIim:** to propose a tool to make easier the measure of the drugs consumption in the neonatology service. **Materials and methods**: every month during 2018 the information of the consumption of six different antibiotics in three healthcare institutions was recorded. The treatment duration was validated and plotted. **Results**: it was demonstrated with R^2>0,8, Syx<15 y R.pearson>0,8, correlation for each institution between calculation per treatment duration and defined daily dose; besides, with P>0,05 in slope and intercept it was established that a line predicted the behavior of the three institutions. **Conclusion**: the consumption of the drugs per treatment duration in a neonatology service is useful to compare drugs and evaluate the impact of clinical interventions.

Keywords: Antibacterial, microbial drug resistance, pediatric, healthcare services.

Resumo

Medição do consumo de antibióticos em unidades neonatais de três instituições de alta complexidade em Antioquia, Colômbia

Introdução: mensurar o consumo de medicamentos é uma estratégia para alcançar o uso racional, mas implementá-la no serviço pediátrico é difícil. **Objetivo:** propor uma ferramenta para facilitar a mensuração do consumo de medicamentos no serviço de neonatologia. **Materiais e métodos:** mensalmente durante o ano de 2018 foi registada a informação do consumo de seis antibióticos diferentes em três instituições de saúde. A duração do tratamento foi validada e plotada. **Resultados:** demonstrou-se com R^2>0,8, Syx<15 e R.pearson>0,8, correlação para cada instituição entre cálculo por duração do tratamento e dose diária definida; além disso, com P>0,05 no declive e no intercepto estabeleceu-se que uma reta predizia o comportamento

das três instituições. **Conclusão:** o consumo de medicamentos por tempo de tratamento em um serviço de neonatologia é útil para comparar medicamentos e avaliar o impacto de intervenções clínicas.

Palavras-chave: Antibacteriano, resistência microbiana a drogas, pediatria, serviços de saúde.

Introducción

La prescripción de acuerdo a las necesidades clínicas del paciente, en las dosis adecuadas, durante un período de tiempo recomendado y al menor costo posible, denominado como uso racional de medicamentos [1], es una necesidad mundial. En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que más del 50% de los medicamentos eran utilizados de manera irracional [2] y el *Institute for Healthcare Informatics* en el año 2012, identificó que se podría ahorrar medio trillón de dólares en el gasto global anual en salud mediante el uso responsable de medicamentos [3].

El uso irracional de antibióticos es uno de los principales problemas a resolver, no solo porque su impacto se ha calculado en aproximadamente USD4000 millones anuales solo en los estados unidos [4], sino también por la resistencia. En el año 2014 se indicó que aproximadamente 700.000 muertes en el mundo fueron atribuidas a la resistencia a antibióticos y se espera que para el año 2050 esta cifra ascienda a 10 millones [5].

De acuerdo a las directrices de la OMS, el uso irracional de medicamentos debe ser medido y analizado para comprender las causas de origen [6, 7]. Los métodos basados en datos globales son los más utilizados para medir consumo de medicamentos, siendo dosis diaria definida (DDD) el de mayor aceptación, por su facilidad para la extracción de la información y la interpretación de los resultados [8].

La medición de consumo de antibióticos en la población pediátrica, especialmente en UCI neonatal es de gran importancia, dado que un alto porcentaje de antibióticos se usan de manera empírica y sin confirmación microbiológica que permita el de-escalamiento temprano [9]. Debido a que DDD requiere de una dosis estándar de consumo por día, su uso en población pediátrica no es viable [10].

La medición de consumo de medicamentos por duración de tratamiento (DOT) aunque más compleja que DDD, es la más aceptada para medir consumo de medicamentos en población pediátrica, dado que su cálculo no se ve afectado por variaciones en las dosis de los medicamentos, que es frecuente en esta población pues la prescripción depende del peso de cada paciente. Este cálculo permite conocer el histórico de con-

sumo de la institución, evaluar variaciones en el tiempo y comparar con referentes, facultando tomar medidas de control en caso de ser necesario y evaluando la efectividad de las intervenciones [11, 12].

En Colombia, El Instituto Nacional de Salud (INS), con el fin de tener una referencia local y conocer el perfil de uso de algunos antibióticos, hace monitoreo por DDD en población adulta [13]; sin embargo, hasta la fecha, no se hace monitoreo de medicamentos en población pediátrica.

El objetivo de este trabajo es proponer a las instituciones de salud una herramienta estandarizada y de libre acceso, que facilite el medir consumo de medicamentos en población pediátrica y comparar los resultados entre instituciones.

Metodología

Instituciones: Participaron en el estudio 3 instituciones de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín, con población adulta, pediátrica y neonatal, además, con cuidado básico y crítico.

Población: Neonatos hospitalizados en salas generales (hospitalización) o cuidado crítico (UCI) entre enero y diciembre de 2018, en tres instituciones de alto nivel de complejidad. Institución 1: 38 camas en hospitalización y 14 en UCI, institución 2: 23 camas en hospitalización y 15 en UCI e institución 3: 42 camas en hospitalización y 10 en UCI.

Medicamentos: Se seleccionaron los 6 antibióticos inyectables de mayor rotación en neonatos (unidades dispensadas) o con inclusión en las guías de práctica clínica del recién nacido (sepsis neonatal temprana publicada en 2013): amikacina, ampicilina, cefepime, meropenem, piperacilina/tazobactam y vancomicina.

Base de datos: Se exportó del sistema de información institucional (SAP® para dos de las instituciones y Servinte® para una institución) a Excel® (Microsoft Office, Redmond, Washington, Estados Unidos), la información que contuviera cada administración de cada medicamento de interés. A la hoja llamada datos_crudos y se adicionaron tres columnas con las funciones requeridas para el cálculo DOT. En la tabla 1 se presenta un ejemplo del uso de las formulas.

Cálculo de DOT 1000 pacientes día: Se realizó de acuerdo a la ecuación 1 para cada mes, medicamento e institución:

$$DOT\ 1000\ pac\ dia = \frac{\sum DOT\ Id\ count\ unique}{dia.cama.ocupada}\ x\ 1000 \qquad \text{Ecuación (1)}$$

Tabla 1. Ejemplo de datos requeridos para el cálculo de DOT en Excel®.

	A	B	C	D	E	F	G
1	**Id.pac**	**Fecha de admon**	**Nombre del med**	**Sitio de admon**	**Mes de admon**	**DOT Id**	**DOT Id count unique**
2	1111	1/01/2018	Amikacina	N hosp	=TEXTO (B2;"MMMYYYY")	=CONCATENAR (A2;B2;C2)	=SI(SUMAPRODUCTO ((F$1:F2=F2)*1)>1;0;1)
3	1111	2/01/2018	Amikacina	N hosp	=TEXTO (B3;"MMMYYYY")	=CONCATENAR (A3;B3;C3)	=SI(SUMAPRODUCTO ((F$1:F3=F3)*1)>1;0;1)
4	2222	1/01/2018	Amikacina	N UCI	=TEXTO (B4;"MMMYYYY")	=CONCATENAR (A4;B4;C4)	=SI(SUMAPRODUCTO ((F$1:F4=F4)*1)>1;0;1)

Id.pac: Identificación del paciente, Fecha de admon: Fecha de administración, Nombre del med: nombre del medicamento, Sitio de admon: lugar (ej sala o puesto) de administración del medicamento, Hosp: hospitalización.

En dos hojas de cálculo en Excel®, llamadas estadística UCI y estadística hosp, se diseñaron las fórmulas para el cálculo de DOT 1000 pacientes día. En la tabla 2 se presenta un ejemplo de cómo realizar el cálculo por medio de funciones para 1 de los antibióticos evaluados. Las columnas A y B deben ser diligenciadas manualmente.

Tabla 2. Ejemplo de las funciones de Excel® requeridas para el cálculo de DOT.

	A	B	C	D
1	UCI neonatal			
2	Fecha	día cama ocupada	Amikacina	
3			DOT ID count	DOT por 1000 pac dia
4	ene-18	382	=SUMAR.SI.CONJUNTO(datos_crudos!$G:$G; datos_crudos!$E:$E;$A4;datos_crudos!$C:$C;C$2; datos_crudos!$D:$D;$A$1:$A$1)	=(C4/ B4)*1000
5	feb-18	336	=SUMAR.SI.CONJUNTO(datos_crudos!$G:$G; datos_crudos!$E:$E;$A5;datos_crudos!$C:$C;C$2; datos_crudos!$D:$D;$A$1:$A$1)	=(C5/ B5)*1000

Validación: Siendo DDD la medición de mayor relevancia para cálculo de consumo de medicamentos, se seleccionó dentro de las mismas instituciones un grupo de pacientes con características óptimas para el cálculo de DDD (adultos, ubicados en hospitalización general y sin patologías que afectaran la dosis administrada de antibióticos). Se realizó análisis de consumo por DDD y DOT por seis meses consecutivos y se evaluó correlación de las mediciones por institución, para el mismo grupo de pacientes e igual medicamento.

Análisis estadístico: Se utilizó el análisis por regresión de la línea recta y correlación de Pearson para validar el cálculo por DOT. Se consideró correlación entre variables, si para cada institución: $R^2 > 0,8$, Syx<15 y R.pearson >0,8. Se consideró que una sola línea predijo el comportamiento de las 3 instituciones si tanto en la pendiente como en el intercepto el valor P>0,05. La comparación entre instituciones se realizó por el método no paramétrico de Kruskal Wallis. Se consideró diferencia estadísticamente significativa un valor de P<0,05.

Gráficas: Se evaluaron diferentes tipos de gráficas, seleccionando para la comparación, aquella que permitiera visualizar la mayor cantidad de datos posible y determinar con facilidad límites de alerta (valor superior al percentil 90)

Resultados

Las gráficas A, B y C de la figura 1 demuestran con R^2>0,8, Syx<15 y R.pearson>0,8, la correlación entre el cálculo de consumo de medicamentos por DDD y por DOT para las 3 instituciones. En la gráfica D de la figura 1 se demuestra que una sola línea describe la correlación de las 3 instituciones (P>0,05 en pendiente e intercepto).

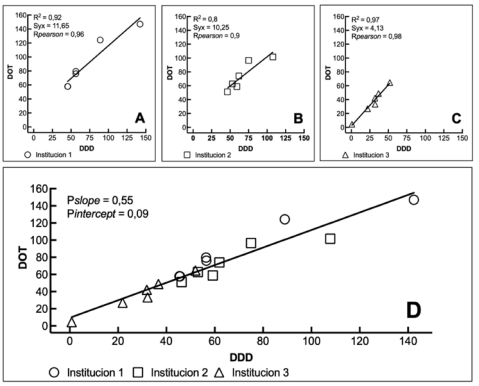


Figura 1. Análisis de correlación entre el cálculo de consumo de medicamentos por DDD y DOT. A: institución 1, B: institución 2, C: institución 3, D: comparación de las pendientes y los interceptos para las 3 instituciones

En la figura 2 se presentan 3 formas diferentes de expresar los datos de consumo de medicamentos. La gráfica de cajas y bigotes fue seleccionada por permitir incluir la mayor cantidad de datos, además de seleccionar y visualizar con claridad límites de alerta [14].

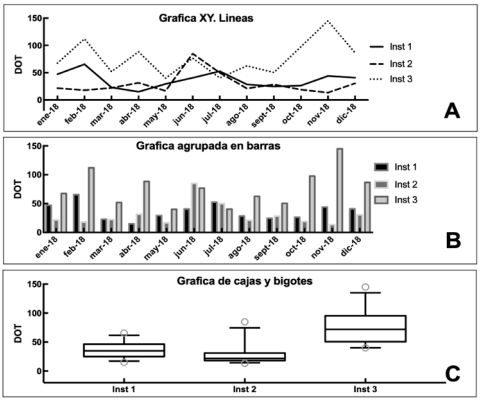


Figura 2. Diferentes formas de presentación de datos de consumo de medicamentos

Las gráficas A, B y C de la figura 3**,** presentan el consumo de los medicamentos en UCI neonatal para las 3 instituciones (P<0,0001). Los medicamentos de mayor consumo son amikacina y ampicilina y los de menor, piperacilina/tazobactam y meropenem.

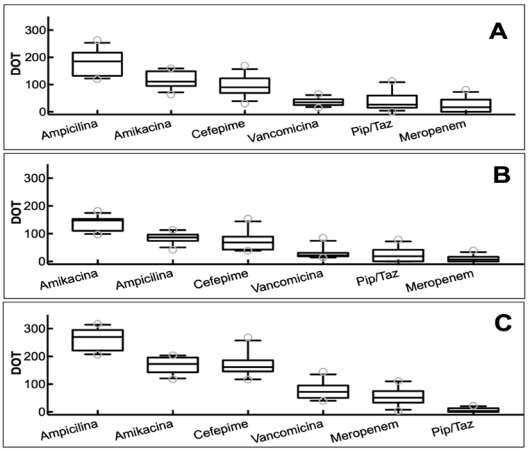


Figura 3. Consumo de medicamentos por DOT para la UCI en cada institución. A: institución 1, B: institución 2, C: institución 3.

En la figura 4 se presenta la comparación en el consumo por DOT para los 6 antibióticos en UCI neonatal y Hospitalización neonatal, respectivamente. Existen diferencias estadísticamente significativas en el consumo de todos los medicamentos evaluados.

Discusión

El *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) propone 7 elementos para enfrentar el uso inadecuado de antibióticos: (1) asignar personal, recursos y tecnología, (2) nombrar un líder encargado de los resultados del programa, (3) asignar un farmacéutico dentro del equipo, (4) implementar al menos una acción procesable, (5) monitorizar el consumo de antibióticos y los patrones de resistencia, (6) presentar informes regulares con información relevante, y (7) educar al personal médico [15]. Muchas de las instituciones de salud están optando por implementar estas directrices, sin embargo, el contar con personal integral, con habilidad clínica, administrativa y de manejo de los software requeridos para la ejecución de los programas continua siendo una limitante [16].

Existen múltiples alternativas para la medición de consumo de medicamentos y ninguna ha demostrado superioridad frente a las demás [8]. Todos los tipos de medición poseen ventajas y desventajas dependiendo de la población objetivo, por lo que se

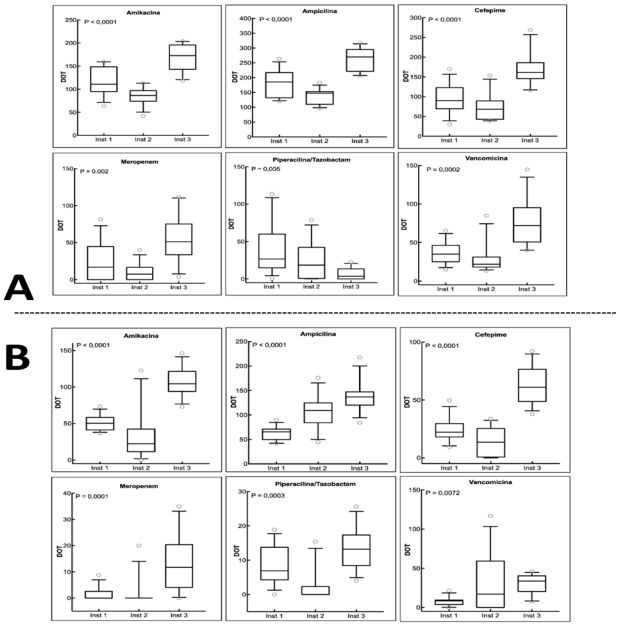


Figura 4. Comparación del consumo por DOT en UCI neonatal (A) y Hospitalización neonatal (B) para tres instituciones de alto nivel de complejidad. Ins: institución.

sugiere identificar las necesidades individuales de las instituciones y seleccionar la alternativa de mayor conveniencia [16].

La medición de consumo de medicamentos por DOT es de gran utilidad para cálculo de consumo en población pediátrica, pero requiere funciones de programación y extracción de información confiable de la historia clínica electrónica [8]. Debido a que la complejidad en el cálculo de DOT es alta, validar el método por medio de la comparación de los resultados entre DDD y DOT en población adulta estándar, permite disminuir la probabilidad de error.

La utilidad de la medición de consumo de medicamentos radica en poder identificar valores de alerta y permitir la comparación entre medicamentos y entre instituciones, que permitan en el tiempo tomar medias de intervención y medir su impacto [11]. Las gráficas de líneas y de columnas aunque ampliamente utilizadas [17] no permiten determinar con facilidad límites de alerta y restringen la cantidad de datos presentados. La gráfica de cajas y bigotes, en cambio, permite tener claridad de límites de alerta, y entre más cantidad de datos más sólido será el resultado [14].

El establecimiento de programas institucionales de administración de antimicrobianos (del inglés *antimicrobial stewardship*) se recomienda como una intervención clave para

reducir el consumo de antibióticos en los hospitales y abordar las altas tasas de bacterias resistentes a múltiples medicamentos (MDR) [18]. Para medir el impacto de estos programas, una de las herramientas más útiles, es la medición de consumo de antibióticos, lo que es complejo sobretodo en unidades pediátricas. En Colombia, las instituciones prestadoras de servicios de salud tienen la obligación de reportar el consumo de algunos antibióticos en DDD para cuidado crítico y hospitalización de adultos; el ministerio de salud procesa dicha información y gestiona acciones que promuevan el uso racional de antibióticos [19]. Existen diferentes estudios que evalúan el consumo de medicamentos en población adulta [20, 21]; sin embargo, la información para población pediátrica y neonatal es bastante limitada. Este trabajo se proyecta como una herramienta para observar diferencias en los patrones de uso de los antibióticos de cada institución, que permita comparar uso de medicamentos con referentes nacionales e internacionales y evaluación de la efectividad de intervenciones realizadas al interior de cada centro.

Existe incertidumbre sobre la veracidad del cálculo por DDD en pacientes adultos con dosis ajustadas de medicamentos, en donde la dosis de mantenimiento fija entregada por la OMS podría no ser adecuada [22]. La medición de consumo por DOT podría ser de utilidad para esta población, tema que amerita ser investigado.

Este estudio posee limitaciones que podrían sesgar el resultado obtenido. Las prescripciones de medicamentos por fuera del sistema electrónico no fueron analizadas, así mismo los potenciales errores de prescripción de los medicamentos dentro del sistema electrónico.

En este estudio se concluye que el análisis de consumo de medicamentos por DOT en población pediátrica, es una herramienta útil para calcular el consumo de antibióticos y permite comparar los resultados obtenidos entre medicamentos e instituciones

Agradecimientos

Agradecemos a Juan David Posada, químico farmacéutico de la clínica bolivariana y a Wilson Builes Galvis, Regente de farmacia del Hospital General de Medellín, Luz Castro de Gutiérrez E.S.E, por la colaboración en la extracción de datos; además a Naira Y. Valencia, Coordinadora de Vigilancia Farmacológica del Hospital Universitario de San Vicente fundación por facilitar el desarrollo de la investigación.

Declaración de autoría

Rendón y Atehortúa diseñaron y estructuraron la propuesta de investigación. Rendón redactó la versión inicial del manuscrito. Todos los autores participaron en la

adquisición o análisis de los datos y todos revisaron y aprobaron la última versión del manuscrito

Declaración de conflicto de intereses

Agudelo, Atehortúa y Echavarría no tienen conflicto de intereses que declarar. Rendón ha recibido honorarios por conferencias independientes o fue invitada a eventos patrocinados por Allergan, Amgen y Dr Reddys. Ninguna de estas compañías o cualquier otra farmacéutica estuvieron involucradas en la financiación, diseño, análisis, ejecución, o la publicación de este estudio.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Conferencia de Expertos sobre Uso Racional de Medicamentos*, 1985, URL: https://apps.who.int/iris/handle/10665/200411. Consultado abril 20, 2019.

2. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Promoción del uso racional de medicamentos: Componentes centrales*, Perspectivas políticas sobre Medicamentos de la OMS. 2002; 1: 1. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ics.2007.02.023.

3. M. Aitken, L. Gorokhovich, Advancing the responsible use of medicines: Applying levers for change. The case for better use of medicines (September 17, 2012), URL: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2222541. Consultado enero 23, 2019.

4. G. Ramos, G. Olivares, S.d. Campo, *Uso racional de medicamentos: una tarea de todos*, Subsecretaria de Salud Publica, Ministerio de Salud de Chile, 2010, URL: https://www.minsal.cl/portal/url/item/8da19e5eac7b8164e04001011e012993.pdf. Consultado abril 20, 2019.

5. S. Allcock, E.H. Young, M. Holmes, D. Gurdasani, G. Dougan, M.S. Sandhu, L. Solomon, M. E. Török, Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities, *Glob. Health Epidemiol. Genom.*, **2**, e4 (2017). DOI: 10.1017/gheg.2017.4 (2) e4 1-7

6. K. Holloway, T. Green, Instrumentos para investigar el uso de medicamentos, en: *Comités de Farmacoterapia*, Guía Práctica OMS, 2003. URL: https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js8121s/8.html.

7. A.R. Araujo da Silva, D.C. Albernaz de Almeida Dias, A.F. Marques, C. Biscaia di Biase, I.K. Murni, A. Dramowski, M. Sharland, J. Huebner, W. Zingg, Role of antimicrobial stewardship programmes in children: a systematic review, *J. Hosp. Infect.*, **99**(2), 117-123 (2018). DOI: 10.1016/j.jhin.2017.08.003.

8. M. Beganovic, K.L. LaPlante, Communicating with facility leadership; metrics for successful antimicrobial stewardship programs (asp) in acute care and long-term care facilities, *R. I. Med. J. (2013)*, **101**(5), 45-49 (2018).

9. N. Tripathi, C.M. Cotten, P.B. Smith, Antibiotic use and misuse in the neonatal intensive care unit, *Clin. Perinatol.*, **39**(1), 61-68 (2012). DOI:10.1016/j.clp.2011.12.003.

10. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Definition and general considerations*, 2 de julio de 2018, URL: https://www.whocc.no/ddd/definition_and_general_considera/. Consultado abril 17, 2019.

11. B.R. Dalton, S.J. MacTavish, L.C. Bresee, N. Rajapakse, O. Vanderkooi, J. Vayalumkal, J. Conly, Antimicrobial use over a four-year period using days of therapy measurement at a Canadian pediatric acute care hospital, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, **26**(5), 253-258 (2015). DOI:10.1155/2015/835209.

12. N.I. Nzegwu, M.R. Rychalsky, L.A. Nallu, X. Song, Y. Deng, A.M. Natusch, R.S. Baltimore, G.R. Paci, M.J. Bizzarro, Implementation of an antimicrobial stewardship program in a neonatal intensive care unit, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **38**(10), 1137-1143 (2017). DOI:10.1017/ice.2017.151.

13. M.L. Ospina-Martínez, M.E. Martínez-Duran, O.E. Pacheco-García, H. Quijada-Bonilla, L.I. Barrero-Garzón, S.M. Rivera-Vargas, A.P. Villalobos-Rodríguez, A.L. Gomez-Rubio, *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Consumo de antibioticos en el ámbito hospitalario*. Instituto Nacional de Salud, 2016, 1(PRO-R02.047), pp. 1-24. URL: http://cruevalle.org/files/PRO-Consumo-antibiotico-intra-hosp.pdf. Consultado febrero 20, 2019.

14. M. Krzywinski, N. Altman, Visualizing samples with box plots, *Nat. Methods*, **11**(2), 119-120 (2014). DOI:10.1038/nmeth.2813.

15. Centers for Disease Control and Prevention NC for E and ZID, Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs, Mayo 7, 2015. URL: https://www.cdc.gov/antibiotic-use/healthcare/implementation/core-elements.html. Consultado abril 25, 2019.

16. T.F. Barlam, S.E. Cosgrove, L.M. Abbo, C. MacDougall, A.N. Schuetz, E.J. Septimus, *et al.*, Executive summary: Implementing an antibiotic stewardship program: Guidelines by the infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America, *Clin. Infect. Dis.*, **62**(10), 1197-1202 (2016). DOI:10.1093/cid/ciw217.

17. H. Honda, S. Murakami, Y. Tagashira, Y. Uenoyama, K. Goto, A. Takamatsu, S. Hasegawa, Y. Tokuda, Efficacy of a postprescription review of broad-spectrum antimicrobial agents with feedback: A 4-year experience of antimicrobial stewardship at a tertiary care center, *Open Forum Infect. Dis.*, **5**(12), ofy314 (2018). DOI:10.1093/ofid/ofy314.

18. S. Doron, L.E. Davidson, Antimicrobial stewardship, *Mayo Clin. Proc.*, **86**(11), 1113-1123 (2011). DOI:10.4065/mcp.2011.0358.

19. H.H. Balkhy, A. El-Saed, A. El-Metwally, Y.M. Arabi, S.M. Aljohany, M. Al Zaibag, S. Baharoon, A.F. Alothman, Antimicrobial consumption in five adult intensive care units: A 33-month surveillance study, *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **7**, 156 (2018). DOI:10.1186/s13756-018-0451-9.

20. M.L. Ospina-Ramírez, Instituto Nacional de Salud, Notificación Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y consumo de antibióticos, 27 de enero, 2016, URL: https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/sivigila/Documents/Circular%20externa_0006.pdf.

21. C. Guzmán-Terán, V. Rodríguez-Rodríguez, A. Calderón-Rangel, Análisis de usos y resistencia a antibióticos en una UCI de Montería, Colombia, *Revista Médica de Risaralda*, **24**(2), 75-80 (2018).

22. J. Castro-Espinosa, E.M. Pinzón-Gómez, Vigilancia del consumo de antimicrobianos en 10 instituciones de salud entre 2013 y 2020 en Colombia, *Revista Chilena de Infectología*, **39**(1), 7-13 (2022).

Cómo citar este artículo

L.M. Rendón, E. Agudelo, A.M. Echavarría, S. Atehortúa, Medición del consumo de antibióticos en unidades neonatales de tres instituciones de alto nivel de complejidad en Antioquia, Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 78-90 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109363

Artículo de investigación científica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109361*

Caracterización química y actividad antimicrobiana de los componentes volátiles de *Eucalyptus* de dos especies de Venezuela

Silvana Villarreal-Rivas[1a*], Luis Rojas-Fermin[1†], Rocelvic Lárez[2b], María Torres[2c], Clara Díaz[3d], María Lucena de Ustáriz[4e], Juan Carmona[5f]

[1] Laboratorio "A" Productos Naturales, Instituto de Investigaciones, "Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela. *Autora de correspondencia.

[2] Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

[3] Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

[4] Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

[5] Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Correos electrónicos: [a] silvanarmn@yahoo.es, [b] larezrocelvic14@gmail.com, [c] majotoorres01@gmail.com, [d] cadg2011@gmail.com, [e] maru_lu@yahoo.com, [f] jcarmona43@hotmail.com

Recibido: 30 de junio de 2022

Revisado: 31 de julio de 2022

Aceptado: 6 de agosto de 2022

Resumen

Objetivo: la presente investigación describe la caracterización química cuali-cuantitativa y la evaluación antimicrobiana de los aceites esenciales (AE) presentes en las hojas de dos especies de *Eucalyptus*, los cuales fueron recolectados en el estado Mérida en la República Bolivariana de Venezuela. **Métodos:** se realizó la extracción de los AE por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. La composición química fue evaluada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con disco, frente a cepas de referencia internacional *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). **Resultados:** los compuestos mayoritarios para la especie *Eucalyptus globulus* fueron: 1,8-cineol (43,36 %), limoneno (15,86 %), *β*-pineno

(14,61 %), *α*-pineno (9,32 %) y para el *Eucalyptus robustus* el *α*-pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), *α*-fellandreno (9,92 %), *β*-pineno (6,96 %), 1,8-cineol (5,79 %). El AE de *E. globulus* inhibió el desarrollo de *S. aureus* una CIM de 0,5 g/mL, *E. faecalis* 0,25 g/mL, *E. coli* y *K. pneumoniae* de 0,125 g/mL, y para *C. albicans* 100 µL/mL y *C. krusei* 50 µL/mL. Por su parte, la especie *E. robustus* presento inhibición con una CIM de 0,125 g/mL contra: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y para *C. albicans* 50 µL/mL y *C. krusei* 10 µL/mL. **Conclusión:** los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad antimicrobiana significativa.

Palabras clave: Myrtaceace, *E. globulus, E. robustus*, aceite esencial, actividad antimicrobiana.

Summary

Chemical characterization and antimicrobial activity of the volatile components of *Eucalyptus* of two species from Venezuela

Objective: this research describes the qualitative-quantitative chemical characterization and antimicrobial evaluation of essential oils (EO) present in the leaves of two species of *Eucalyptus*, which were collected in the state of Mérida in the Bolivarian Republic of Venezuela. **Methods:** the essential oils were extracted by the hydrodistillation method using the Clevenger trap. The chemical composition was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antimicrobial activity was determined by the agar disk diffusion method, against international reference strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) and *Candida krusei* (ATCC 6258). **Results:** the main compounds for the species *Eucalyptus globulus* were: 1,8-cineol (43.36%), limonene (15.86%), *β*-pinene (14.61%), *α*-pinene (9.32%) and for *Eucalyptus robustus α*-pinene (37.61%), *p*-cymene (11.09%), *α*-fellandrene (9.92%), *β*-pinene (6.96%), 1.8 -cineol (5.79%). The EO of *E. globulus* inhibited the development of *S. aureus* an MIC of 0.5 g/mL, *E. faecalis* 0.25 g/mL, *E. coli* and *K. pneumoniae* of 0.125 g/mL, and for *C. albicans* 100 µL/mL and *C. krusei* 50 µL/mL. For its part, the species *E. robustus* presented inhibition with a MIC of 0.125 g/mL against: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and for *C. albicans* 50 µL/mL and *C. krusei* 10 µL/mL. **Conclusion:** the essential oils of *E. globulus* and *E. robustus* showed significant antimicrobial activity.

Keywords: Myrtaceace**,** *E. globulus, E. robustus*, essential oils, antimicrobial activity.

Resumo

Caracterização química e atividade antimicrobiana dos componentes voláteis de *Eucalyptus* de duas espécies da Venezuela

Objetivo: esta pesquisa descreve a caracterização química qualitativa-quantitativa e avaliação antimicrobiana de óleos essenciais (EA) presentes nas folhas de duas espécies de eucalipto, que foram coletadas no estado de Mérida na República Bolivariana da Venezuela. **Métodos:** a extração dos OEs foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando a armadilha de Clevenger. A composição química foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em disco de ágar contra as cepas de referência internacional *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) e *Candida krusei* (ATCC 6258). **Resultados:** os principais compostos para a espécie *Eucalyptus globulus* foram: 1,8-cineol (43,36%), limoneno (15,86%), *β*-pineno (14,61%), *α*-pineno (9,32%) e para *Eucalyptus robustus α*-pineno (37,61%), *p*-cimeno (11,09%), *α*-felandreno (9,92%), *β*-pineno (6,96%), 1,8-cineol (5,79%). O OE de *E. globulus* inibiu o desenvolvimento de *S. aureus* uma CIM de 0,5 g/mL, *E. faecalis* 0,25 g/mL, *E. coli* e *K. pneumoniae* de 0,125 g/mL, e para *C. albicans* 100 µL/ mL e *C. krusei* 50 µL/mL. Por sua vez, a espécie *E. robustus* apresentou inibição com CIM de 0,125 g/mL contra: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e para *C. albicans* 50 µL/mL e *C. krusei* 10 µL/mL. **Conclusão:** os óleos essenciais de *E. globulus* e *E. robustus* apresentaram atividade antimicrobiana significativa.

Palavras-Chave: Myrtaceace**,** *E. globulus, E. robustus*, óleo essencial, atividade antimicrobiana.

Introducción

La familia Myrtaceae se compone de aproximadamente de 130 géneros y unas 5000 especies, los cuales son árboles y arbustos tropicales, siendo los principales centros de distribución las zonas tropicales de América y Asia, junto con Australia. Uno de los géneros más conocidos es el *Eucalyptus* L'Hér., el cual es muy abundante con cerca de 700 especies, casi todas nativas de Australia, muchas de ellas ricas en aceite esencial con alto contenido de eucaliptol (líquido miscible con alcohol), el cual se utiliza en la medicina popular como analgésico, antiinflamatorio y antipirético [1, 2].

Entre las especies del género *Eucalyptus* L'Hér., se encuentra *E. globulus* Labill., siendo una especie arbórea originaria del suroeste de Australia y Tasmania, su rápido crecimiento le ha dado lugar al aprovechamiento industrial [3]; y el *E. robustus* Sm., la cual es una especie que se adapta a una extensa variedad de climas y ha sido introducida en muchos climas tropicales, subtropicales y templados cálidos, incluyendo Venezuela [4]. Estas dos especies se les atribuyen diversas propiedades, entre las cuales destaca: efectos antirreumático, antiséptico, analgésico, antidiarreico, antifúngico y antibacteriano [5, 6].

Las dos especies de *Eucalyptus*, están fundamentalmente constituidas por el denominado aceite de eucalipto, el cual se caracteriza por ser volátil, destilado a partir de las hojas frescas, es un líquido incoloro o ligeramente amarillento que tiene propiedades aromáticas muy características. El componente principal del aceite de eucalipto es el eucaliptol (1,8-cineol), así mismo está constituido por pequeñas cantidades de aldehídos volátiles, terpenos, sesquiterpenos, aldehídos aromáticos, alcoholes y fenoles [7-10].

Por su parte, el eucaliptol tiene propiedades antisépticas particularmente de las vías respiratorias y urinarias, antipirético, balsámico y estimulante [11]. Es importante destacar, que los aceites esenciales cumplen una labor fundamental en las plantas, estos compuestos han sido creados en el laboratorio químico de la naturaleza para proteger y prolongar la vida de las plantas, ya que a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores, actuando como repelentes de insectos, bacterias, hongos y animales herbívoros, previniendo así la destrucción de las flores y hojas; otras veces, las esencias de las flores y del polen actúan como hormonas de polinización, atrayendo a las abejas y a otros insectos, con lo cual ayudan en la fertilización cruzada de ciertas plantas [12].

Por lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se plateó un estudio comparativo de los componentes volátiles de las especies *E. robustus* Sm., y *E. globulus* Labill., pertenecientes a la familia botánica Myrtaceae en Mérida-Venezuela, asimismo se determinó la actividad antimicrobiana de dichas especies frente a microorganismos patógenos.

Materiales y Métodos

Materia vegetal e identificación botánica

Las hojas de las especies *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., (Myrtaceae) fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis "Dr. Luis Ruiz Terán", Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela. La muestra estuvo integrada por la recolección de un (1) kilo de hojas frescas de las especies vegetales para la extracción de los aceites esenciales y los ensayos de actividad antimicrobiana. La determinación botánica la realizó el Ing. Juan Carmona y un voucher de cada mues-

tra fue depositado bajo el número 01, en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

Extracción de los aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., las hojas frescas (1,0 Kg) se separaron del resto del material vegetal y se licuaron con agua, con la finalidad de romper las células que contienen el aceite aromático. Las preparaciones se sometieron a ebullición mediante el método de hidrodestilación, utilizando la trampa de Clevenger. El proceso se realizó durante 3 horas, hasta obtener un aceite esencial de color característico de cada especie vegetal. Los aceites obtenidos se trasvasaron a un envase ámbar y se les adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminarle la humedad. Fueron guardados a baja temperatura de 4-6 °C, tomando la precaución de protegerlos de la luz y de la presencia de oxígeno, debido a que estos factores alteran la composición de las esencias oxidando los dobles enlaces y cambiando la configuración de algunos componentes [13].

Determinación de compuestos químicos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Las esencias obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6898, con columna de fenil-metil-polixilosano de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro (HP-5 MS) y equipado con un detector de masa marca Hewlett-Packard modelo 5973. La identificación de los componentes se realizó usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición [14]. Para el análisis se preparó una solución de 20 µL de cada aceite en 1 mL de éter dietílico. De cada muestra se inyectó 1,0 mL, para su análisis el tiempo fue de 50 min y se utilizó helio como gas portador, ajustado a una velocidad lineal de 0,8 mL/min. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: iniciándose en 60 °C durante cero (0) minutos, luego se incrementó a razón de 4 °C/min hasta 260 °C. El inyector se mantuvo a 200 °C. La relación de reparto fue de 1:100.

Cálculo de los Índices de Kováts

El cálculo de los índices de Kováts se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosysten. Se compararon los tiempos de retención de los componentes de cada aceite esencial con una serie de *n*-parafinas (C_7-C_{22}) [15]. Los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura [16, 17].

Determinación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó la técnica de difusión en agar con discos, llamada también método de Kirby-Bauer, empleando bacterias y levaduras de

referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Candida albicans* (CDC B-385) y *Candida krusei* (ATCC 6258) de acuerdo a la siguiente metodología:

Preparación de las placas: Para las bacterias se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri [18] y para las levaduras 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 μg/mL) [19]. Luego las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Preparación de los discos: Se emplearon discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche previa al ensayo. Posteriormente fueron impregnados con 10 μL de cada aceite por separado y de igual modo se impregnaron discos con el solvente utilizado (dimetil-sulfóxido DMSO puro al 99,9%), como control negativo.

Preparación del inóculo microbiano: Cada inoculo bacteriano se preparó en solución salina fisiológica (SSF) estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, y las levaduras en agar Sabouraud dextrosa con antibiótico control para cada cepa, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland Nº 0,5 ($1 \times 10^{6\text{-}8}$ UFC/mL) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de McFarland Nº 1 (3×10^{8} UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias).

Inoculación: En el caso de las cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un aplicador estéril. Para las levaduras una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se suspendió 1 mL del mismo en 20 mL de agar Müeller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de petri una vez solidificado el agar y seco el inoculo. Se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con los aceites y con el control negativo sobre la superficie del agar inoculado. Asimismo, el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo según el microorganismo [20].

Incubación: Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müeller-Hinton éstas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos (Pre-incubación); luego se incubó a 37 °C por 24 horas en posición invertida, en atmósfera aeróbica.

Lectura de los ensayos: Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. La medición de los diámetros de inhibición alrededor de los discos impregnados con los aceites, son producto de la acción antimicrobiana y se expresaron en milímetros

para luego realizar su comparación con las tablas de referencia permitiendo calificar a la cepa como resistente, intermedia o susceptible a los aceites empleados. Se ha reportado que cepas Gram positivas susceptibles a aceites esenciales de especies del género *Eucalyptus* L'Hér., el diámetro del halo de inhibición oscila entre 15 y 85 mm y de las baterías Gram negativas de 26,0 ± 0,00 mm [21, 22].

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible [18]. Este método consiste en enfrentar a las cepas de referencia a diferentes concentraciones de las muestras [23]. La cual se realizó preparando diluciones de los aceites esenciales con DMSO, y se impregnaron discos con 10 µL de cada dilución, para luego ser evaluados por el método de difusión en agar con discos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados y Discusión

Composición química de los aceites esenciales de *E. globulus Labill.,* y *E. robustus Sm.*

En la extracción del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* Labill., se obtuvo 2 mL de aceite a partir de 148,44 g de hojas (rendimiento 1,35 %). En cuanto a la identificación de los compuestos volátiles, el cromatograma reportó 14 compuestos, los cuales representan el 99,99 % del total del aceite extraído. Siendo los mayoritarios: 1,8-cineol (43,36 %), el limoneno (15,86 %), el *β*-pineno (14,61 %), y el *α*-pineno (9,32 %) (Tabla 1). Con respecto al aceite esencial del *Eucalyptus robustus* Sm., se obtuvo 3,5 mL de aceite a partir de 414,60 g de las hojas (rendimiento 0,84 %). En cuanto a la identificación de los compuestos volátiles, el cromatograma reportó 20 compuestos, los cuales representan el 98,76 % del total del aceite extraído. Siendo los mayoritarios: *α*-pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), *α*-fellandreno (9,92 %), *β*-pineno (6,96 %), *α*-terpineol (6,21 %), y al igual que el *E. globulus* Labill., presentó el limoneno (6,08 %), y el 1,8-cineol (5,79 %), aunque en menor proporción (Tabla 2).

Tabla 1. Componentes del aceite esencial de las hojas de *E. globulus* Labill.

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
1	*α*-pineno	5,43	9,32	931	932
2	Canfeno	5,78	0,71	944	946
3	*β*-pineno	6,45	14,61	967	974
4	*β*-mirceno	6,72	0,77	975	988

(*Continúa*)

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
5	Limoneno	7,80	15,86	1010	1024
6	1,8-cineol	7,92	43,36	1016	1026
7	Terpinoleno	9,52	0,90	1082	1086
8	Endofenchol	10,31	0,67	1111	1114
9	Borneol	11,98	0,87	1166	1165
10	4-terpineol	12,34	1,31	1176	1185
11	α-terpineol	12,77	4,90	1189	1186
12	Aromadendreno	20,72	1,95	1444	1439
13	Espatulenol	25,06	3,68	1582	1579
14	Viridiflorol	25,28	1,08	1588	1592

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

Los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico coincide con el reportado por González-Guiñez *et al.* [24] en la publicación titulada: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (Myrtaceae) para el control de *Sitophilus zeamais* motschulsky, donde se evidencia el efecto repelente del aceite esencial de dichas especies, y en el análisis fitoquímicos indicaron que los mayores constituyentes del aceite esencial de ambas especies son 1,8-cineol (eucaliptol) (55,49 % en *E. globulus* y 59,85 % en *E. nitens*) y α-pineno (18,18 % en *E. globulus* y 18,36 % en *E. nitens*). No existe una correlación entre la concentración de 1,8 cineol y α-pineno y el efecto repelente, lo que indica que estos compuestos no actúan de forma aislada sino que en conjunto con otros presentes en el aceite esencial, como citronelal, citronelol, citronelil de etilo, *p*-cimeno, eucamalol, limoneno, linalool, α-pineno, γ-terpineno, α-terpineol, alloocimeno y aromadendreno, de los cuales la mayoría se encuentran presentes en la muestras estudiadas.

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de las hojas de *E. robustus* Sm.

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
1	α-pineno	5,45	37,61	932	932
2	β-pineno	6,45	6,96	966	974
3	β-mirceno	6,73	0,99	975	988
4	α-fellandreno	7,12	9,92	987	1002
5	*p*-cimeno	7,67	11,09	1004	1020
6	Limoneno	7,78	6,08	1009	1024

(*Continúa*)

Tabla 2. (*Continúa*)

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
7	1,8-cineol	7,88	5,79	1014	1026
8	α-terpineno	8,63	1,26	1047	1054
9	Terpinoleno	9,53	1,28	1083	1086
10	Endofenchol	10,31	0,65	1111	1114
11	Borneol	11,98	0,80	1166	1165
12	Terpinen-4-ol	12,34	2,17	1176	1174
13	α-terpineol	12,77	6,21	1189	1186
14	Piperitona	14,85	1,01	1258	1249
15	Aromadendreno	20,72	0,84	1444	1439
16	Biciclogermacreno	22,47	0,68	1503	1500
17	Espathulenol	24,86	0,70	1576	1579
18	γ-gurjuneno	25,05	3,34	1582	1475
19	Viridiflorol	25,27	0,78	1588	1592
20	α-eudesmol	27,00	0,60	1653	1630

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

Asimismo, los datos obtenidos no guardan mucha diferencia con los reportados por Yáñez *et al.* [25] a los aceites esenciales de las hojas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, de Colombia, que fueron obtenidos por hidrodestilación y analizados por la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (GCAR) se identificaron doce componentes mayoritarios: 1,8-cineol o eucaliptol (77-82 %), α-pineno, limoneno, α-terpineno, α-copaeno, guaiol, α-felandreno, β-terpinen-4-ol, linalol, α-terpineol, mirceno y β-selineno.

Además, la presente investigación se correlaciona con los resultados aportado por Jinbiao *et al.* [26], donde el número de componentes identificados y principales en aceites esenciales de diferentes especies de eucaliptos presentan el 1,8-cineol. Los principales componentes son monoterpenos (1,8-cineol, *p*-cimeno, citronelal, citronelol, limoneno, α-fellandreno, β-fellandreno, α-pineno, β-pineno, terpinoleno, α-terpineol, y α-tujeno) y sesquiterpenos (β-cariofileno, β-eudesmol, globulol, espatulenol y viridiflorol). El perfil químico y los componentes principales de los aceites de hojas de eucalipto varían significativamente entre las especies. Esta diferencia se ha observado incluso entre los árboles de la misma especie en diferentes períodos, sitios, método y tiempo de extracción.

Finalmente, se ha reportado que los metabolitos secundarios volátiles identificados en los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, empleando las diferentes técni-

cas de extracción, cambiaron ligeramente en sus respectivas concentraciones. La variabilidad en los porcentajes de los componentes químicos, pudo estar influenciado por diversos factores, tales como, la técnica de extracción (arrastre con vapor o hidrodestilación asistida por microondas), el tratamiento de la hoja (fresca o seca), las condiciones del suelo y la edad de la planta, así como por cambios de tipo genético [27].

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *E. globulus Labill.,* y *E. robustus Sm.*

Los resultados obtenidos de la actividad de los aceites esenciales de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm., fueron reportados en la Tabla 3, donde se observa resultados positivos significativos frente a todas las cepas ensayadas como: bacterias Gram positivas *S. aureus* (ATCC 25922) con halos de 26 y 23 mm (*E. globulus y E. robustus*), y *E. faecalis* (ATCC 19433) con 25 y 18 mm de diámetro respectivamente. Bacterias Gram negativas *E. coli* (ATCC 25922) (21 y 20 mm *E. globulus y E. robustus*) y *K. pneumoniae* (ATCC 23357) (15 y 19 mm *E. globulus y E. robustus*). Asimismo, las levaduras como *C. albicans* (CDC B-385) y *C. krusei* (ATCC 6258) con 8, 8 y 7, 8 mm (*E. globulus y E. robustus*) respectivamente.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *E. globulus* Labill., y *E. robustus* Sm.

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)*							
	Aceite *E. globulus*	Aceite *E. robustus*	Control Positivo ERT	AMK	AMP	AMK	FLU	VON
Staphylococcus aureus ATCC 25922	26*	23*	27*					
Enterococcus faecalis ATCC 19433	25*	18*		26*				
Escherichia coli ATCC 25922	21*	20*			23*			
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	15*	19*				21*		
Candida albicans CDC B-385	8*	8*					10*	
Candida krusei ATCC 6258	7*	8*						14*

Controles positivos: ERT: Eritromicina® (10mg), AMK: Amikacina® (30 mg), AMP: Ampicilina® (10 mg), Fluconazol® (300 mg) VOR: Voriconazol® (400 mg); control negativo: Dimetil sulfóxido. *Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos.

Asimismo, se muestra la concentración inhibitoria mínima (CIM), para ello se prepararon distintas diluciones con un rango de concentración desde 1-0,06 g/mL para el

ensayo antibacteriano y con respecto a las levaduras el rango de concentración fueron desde 500-10 mg/mL. Con respecto a la especie *E. globulus* Labill., presentó contra *S. aureus* una CIM de 0,5 g/mL, para *E. faecalis* 0,25 g/mL, para *E. coli* y *K. pneuminiae* fue de 0,125 g/mL, y para las levaduras *C. albicans* 100 µL/mL y *C. krusei* 50 µL/mL (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración Inhibitoria Mínima de la especie *E. globulus* Labill.

Microorganismos	**Zona de Inhibición (mm)***								
	Aceite *E. globulus* 0,5 g/ 500 mL DMSO								
	1 g/mL	0,5 g/mL		0,25 g/mL		0,125 g/mL		0, 06 g/mL	
Staphylococcus aureus ATCC 25922	8*	6*		NA		NA		NA	
Enterococcus faecalis ATCC 19433	10*	6*		5*		NA		NA	
Escherichia coli ATCC 25922	13*	10*		8*		5*		NA	
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	7*	7*		6*		5*		NA	
	µL/mL	500	400	300	200	100	50	20	10
Candida albicans CDC B-385		9*	8*	8*	7*	6*	NA	NA	NA
Candida krusei ATCC 6258		14*	12*	11*	11*	8*	7*	NA	NA

NA: no activo.

Por su parte, la especie *E. robustus* Sm., presentó contra *S. aureus* una CIM de 0,125 g/mL, para las bacterias Gram positivas y Gram negativas y para las levaduras *C. albicans* 50 µL/mL y *C. krusei* 10 µL/mL (Tabla 5). Estos resultados son comparables a los reportados en la literatura, donde el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp*.) presenta propiedades antibacterianas para bacterias Gram negativas *E. coli* y Gram positivas *S. aureus* [28]. De igual forma se ha reportado que las especies en estudio poseen actividad antibacterial, antifungal, entre otras actividades biológicas [26].

Recientemente, se ha reportado la eficacia antibacteriana del aceite esencial de *E. globulus* para usarlo con fines industriales, ya que tiene actividad frente a bacterias Gram positivos y algunas levaduras [21], razón de ser compuesto en un gran porcentaje por eucalipto que se presume es el responsable de esta actividad [29, 30]. En resumen, los AE presentan su acción antibacteriana de acuerdo a diversos mecanismos que son dependientes del tipo de microorganismo. Estos mecanismos están principalmente asociados a los cambios en los canales de iones como el sodio, potasio y calcio, que

Tabla 5. Concentración Inhibitoria Mínima de la especie *E. robustus* Sm.

Microorganismos	**Zona de Inhibición (mm)***								
	Aceite *E. robustus* 0,5 g/ 500 mL DMSO								
	1 g/mL	0,5 g/mL		0,25 g/mL		0,125 g/mL		0,06 g/mL	
Staphylococcus aureus ATCC 25922	19*	15*		11*		10*		NA	
Enterococcus faecalis ATCC 19433	8*	8*		7*		6*		NA	
Escherichia coli ATCC 25922	12*	10*		8*		6*		NA	
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	10*	8*		8*		7*		NA	
	µL/mL	500	400	300	200	100	50	20	10
Candida albicans CDC B-385		9*	8*	7*	7*	7*	7*	NA	NA
Candida krusei ATCC 6258		14*	13*	11*	11*	10*	8*	7*	7*

NA: no activo.

aumentan la permeabilidad de la membrana bacteriana y propician su ruptura, con la consecuente liberación de sus constituyentes intracelulares [31].

Por lo tanto, la actividad bactericida y antifúngica de especies de *Eucalyptus* spp., está estrechamente relacionada con los fenoles y monoterpenos que poseen, debido a que son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno o bien, gracias a su hidrofobicidad, pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana, en donde ocurre una fuga de iones y otros compuestos del microorganismo [32].

Conclusiones

A partir de este estudio, se puede concluir que el AE obtenido de las hojas de *E. globulus* Labill., los componentes químicos mayoritarios encontrados por análisis fitoquímico, fueron: 1,8-cineol (43,36 %), limoneno (15,86 %), *β*-pineno (14,61 %), y *α*-pineno (9,32 %). Por su parte el AE de las hojas de *E. robustus* Sm., fueron: *α*-pineno (37,61 %), *p*-cimeno (11,09 %), *α*-fellandreno (9,92 %), *β*-pineno (6,96 %), *α*-terpenol (6,21%), limoneno (6,08 %), y 1,8- cineol (5,79 %). Tanto los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad contra las bacterias de cepas ATCC*: S .aureus, E. faecalis, E. coli y K. pneumoniae.*

Finalmente, todas las diluciones ensayadas en los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. robustus* mostraron actividad contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*, obteniéndose para las mismas una CIM de 100 µL/mL con un halo de inhibición de 6 mm de diámetro y 50 µL/mL con un halo de inhibición de 7 mm de diámetro respectivamente. Y contra cepas ATCC 6258 de *Candida Krusei* obteniéndose para *E. globulus* una CIM de 50 µL/mL con halo de inhibición de 7 mm, y para *E. robustus* una CIM de 10 µL/mL con halo de inhibición de 6 mm de diámetro. Estos resultados son interpretados como actividad significativa.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Universidad de Los Andes) y en especial al Dr. Luis Rojas (QEPD) por el análisis de los resultados cromatográficos gases-masa.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. J. Silva, W. Abebe, S. Sousa, V. Duarte, M. Machado, F. Matos, Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*, *Journal of Ethnopharmacology*, **89**(2), 277 (2003).

2. D. Granados-Sánchez, G.F. López-Ríos, Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*, *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, **13**(2), 143-156 (2007).

3. S.S.S Gomes, A.H.C. Bittencourt, Estudo e avaliação da ação antibacteriana de *Eucalyptus globulus* L. e *Allium sativum* L. sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *SAPIENS-Revista de divulgação Científica*, **1**(2), 19 (2019).

4. E.L. Barnard, Occurrence, impact, and fungicidal control of girdling stem cankers caused by *Cylindrocladium scoparium* on eucalyptus seedlings in a south Florida nursery (*Eucalyptus grandis, Eucalyptus robustus, benomyl, Chlorothalonil*, *copper* hydroxide), *Plant Disease*, **68**(6), 471-473 (1984).

5. D.A. Amaya, *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Eucaliptus globulus "eucalipto", sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 comparado con oxacilina*, tesis de grado, Universidad César Vallejo, Perú, 2018.

6. M.B. Vignola, M. Serra, A.E. Andreatta, Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos, *Revista Tecnología y Ciencia*, **18**(37), 92-100 (2020).

7. V.R. Preedy, *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Elsevier, 2016.

8. C.I. Viturro, Volatile components of *Eucalyptus globulus Labill*. Ssp., bicostata from Jujuy, Argentina, *Journal of Essential Oil Research*, **15**, 206-208 (2003).

9. N.A. Trivedi. S.C. Hotchandani, A study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*, *Indian Journal of Pharmacology*, **32**, 93-95 (2004).

10. B. Damjanović-Vratnica, T. Tatjana-Dakov, D. Suković, J. Damjanović, Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill, *Food Science*, **29**(3), 277-284 (2011).

11. Q.M. Guo, X.W. Yang. Cypellocarpin C and other compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill, *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**(6), 543-545 (2006).

12. F.E. Argote-Vega, Z.J. Suarez-Montenegro, M.E. Tobar-Delgado, J.A. Pérez-Álvarez, A.M. Hurtado-Benavides, J. Delgado-Ospina, Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **15**(2), 52-60 (2017).

13. G.R. Takeoka, M. Guentert, S.L. Smith, W. Jennings, Changes in aroma concentrates during storage, en: *Biogeneration of aromas*, T.H. Parliament, R. Croteau (editors), Washington D. C., 1986, p. 65.

14. P. Sandra, C. Bicchi, *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, Heidelberg: Huethig, 1987.

15. E. Kováts, Retentinsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone, *Helvetica Chimica Acta*, **XLI**, 1915 (1958).

16. R. Adams, *Identificación de compuestos de aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas*, 4ª edición, Illinois, 2007, 1-804 p.

17. N.W. Davies, Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases, *Journal of Chromatography*, **503**, 1-24 (1990).

18. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed., CLSI supplement M100.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2018, pp. 1-15.

19. NCCLS, *Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline*, NCCLS document EP5-A2, 2nd ed., Wayne, Pennsylvania, 2004.

20. J. Velasco, J. Rojas, P. Salazar, M. Rodríguez, T. Díaz, A. Morales, M. Rondón, Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin, *Natural Product Communication*, **2**(1), 85-88 (2007).

21. M. Boukhatem, A. Boumaiza, H. Nada, M. Rajabi, S. Mousa, *Eucalyptus globulus* essential oil as a natural food preservative: Antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (Orangina fruit juice), *Applied Science*, **10**(16) 5581 (2020).

22. H. Tolba, H. Moghrani, A. Aboun, R. Maachi, Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antimicrobial activity, *Nature & Technology Journal, Vol. B: Agronomic and Biological Sciences*, **18**, 19-27 (2018).

23. L. Araujo-Baptista1, K. Vimos-Sisa, R, Cruz-Tenempaguay, F. Falconí-Ontaneda, L. Rojas-Fermín, A. González-Romero, Componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador, *Acta Biológica Colombiana*, **25**(1), 22-28 (2020).

24. R. González-Guiñez, G. Silva-Aguayo, A. Urbina-Parra, M. Gerding- González, Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (Myrtaceae) para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Chilean Journal of Agriculture and Animal Science*, *ex Agro-Ciencia*, **32**(3), 110-116 (2016).

25. R.X. Yáñez, M.O. Cuadro, Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia), *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, **10**(1), 52-61 (2012).

26. Z. Jinbiao, A. Min, W. Hanwen, S. Rex, L. Deirdre, Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils, A*llelopathy Journal*, **25**(2), 313-330 (2010).

27. H. Ghelichnia, Essential oil composition of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger at different growing altitudes in Mazandaran, Iran, *Cercetari Agronomice în Moldova*, **51**(2), 75- 83 (2018).

28. N. Morocho, *Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus spp.) sobre cepas certificadas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus*, tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, 2018.

29. C.M. Zamora-Ramírez, C.J. Toro-Huamanchumo, Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión, *Revista Médica Vallejiana*, **10**(2) 93-104 (2021).

30. M.G. Hualca, I.S. Meregildo, *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Eucalyptus globulus (eucalipto) sobre Staphylococcus aureus*, tesis de grado, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Roosevelt, Huancayo-Perú, 2021.

31. M. Sánchez, J. Araujo, Actividad antibacteriana de un gel experimental de *Eucalyptus globulus* Labill frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **40**(2) e1104 (2021).

32. M. Montero-Recalde, M.J. Morocho-Núñez, D. Avilés-Esquivel, Á. Carrasco-Cando, R. Erazo-Gutiérrez, Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **30**(2) 932-938 (2019).

Como citar este artículo

S. Villarreal-Rivas, L. Rojas-Fermin, R. Lárez, M. Torres, C. Díaz, M. Lucena de Ustáriz, J. Carmona, Caracterización química y actividad antimicrobiana de los componentes volátiles de *Eucalyptus* de dos especies de Venezuela. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*., **52**(1), 91-106 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109361

Technical note / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109364*

A simple strategy for washing a recrystallized drug from viscous and non-volatile solvents prior to XRD study: A technical note

Elaheh Rahimpour[1,2], Abolghasem Jouyban[1,3]*

[1] Pharmaceutical Analysis Research Center and Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

[2] Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz.

[3] Faculty of Pharmacy, Near East University, PO BOX: 99138 Nicosia, North Cyprus, Mersin 10, Turkey.

*Correspondence author emails: ajouyban@hotmail.com and ghasemjouyban@gmail.com

Received: August 16, 2022

Corrected: August 18, 2022

Accepted: August 19, 2022

Summary

Aim: obtaining a dried powder residual from a viscous and non-volatile solvents is impossible. Thus, their analysis by using the methods required for the dried form of materials has always been a problem. In the current technical note, our aim was to offer a simple method for this issue. **Results:** the proposed method was based on washing of the viscous residuals with a volatile solvent and their drying in the ambient conditions. For this purpose, we have provided sufficient data on some drugs in the selected viscous and non-volatile solvents to support our claim.

Keywords: Crystal structure, viscose solvents, non-volatile solvents.

Resumen

Una estrategia simple para lavar un fármaco recristalizado de solventes viscosos y no volátiles antes del estudio DRX: una nota técnica

Objetivo: es casi imposible obtener un residuo de polvo seco a partir de disolventes viscosos y no volátiles. Por lo tanto, su análisis mediante el uso de los métodos nece-

sarios para la forma seca de los materiales siempre ha sido un problema. En esta nota técnica nuestro objetivo es ofrecer un método simple para este problema. **Resultados:** el método propuesto se basa en el lavado de los residuos viscosos con un solvente volátil y su secado en condiciones ambientales. Para este propósito, hemos proporcionado datos suficientes sobre algunos fármacos en los solventes viscosos y no volátiles seleccionados para respaldar nuestra afirmación.

Palabras clave: Estructura cristalina, disolventes viscosos, disolventes no volátiles.

Resumo

Uma estratégia simples para lavar uma droga recristalizada de solventes viscosos e não voláteis antes do estudo DRX: uma nota técnica

Objetivo: a obtenção de um resíduo de pó seco a partir de solventes viscosos e não voláteis é impossível. Assim, sua análise usando os métodos necessários para a forma seca dos materiais sempre foi um problema. Na presente nota técnica, nosso objetivo é oferecer um método simples para essa questão. **Resultados:** o método proposto baseia-se na lavagem dos resíduos viscosos com um solvente volátil e sua secagem em condições ambientais. Para este propósito, fornecemos dados suficientes sobre algumas drogas nos solventes viscosos e não voláteis selecionados para apoiar nossa afirmação.

Palavras-chave: Estrutura cristalina, solventes de viscose, solventes não voláteis.

INTRODUCTION

There are three forms of crystal types for pharmaceutical solids including polymorphic, hydrate/solvate and amorphous forms [1]. Polymorphs are defined as the substance crystallization in different crystal packing arrangements [2]. Hydrate/solvate is defined as the incorporation of water/solvent in the crystal lattice and amorphous is defined as a solid with no crystallinity and no specific arrangement [3]. Controlling the crystal form of the drug substances is a very important issue, as it can affect their bioavailability and stability [4, 5]. Therefore, in the new drug application, the information on solid state properties is highly demanded by the regularities [6]. For obtaining this information, the solid substance must be characterized using some methods such as X-ray powder diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), elemental analysis,

etc. However, for most of these analysis methods, the required form of the substance is dried solid form. This can be considered a limitation when the recrystallization is carried out from a viscous and non-volatile solvent for our investigations. Because the pharmaceutical solids form a viscous substance that cannot be dried under any conditions, their analysis and controlling their crystallinity in these solvents are not possible. In the current technical note, a simple and practical technique to aid recrystallization and analysis of drug residuals from the viscous and non-volatile solvents, is reported.

Technique

Because this technique is almost applicable in solubility studies, we describe it based on the shake-flask method. The investigated drug was dispensed in excess amounts into the vessels containing viscous solvents and incubated to reach equilibrium. After centrifugation, the drug residuals were separated and washed with a volatile solvent several times until a homogenous suspension was formed without any signs of particles sticking together. The suspension was poured into a plate and was placed at room temperature until washing solvent was evaporated and left a dry powder.

Results and discussion

XRD analysis is one of most important analytical technique for studying the crystalline phase in solubility investigations. The main limitation of this technique is that the acceptable drug sample form for analysis must be a dried solid powder. Whereas, most of the commonly used solvents in the pharmaceutical industry such as *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), Carbitol®, polyethylene glycols (PEGs), or propylene glycol (PG) are viscous and non-volatile. Thus, the dispensed drug powder into these solvents is turned into a viscous mixture that cannot be analyzed. In the current work and in order to show the efficiency of the proposed technique, we chose some drugs as the model drugs and some solvents as the viscous solvents. Two drugs in base form (lamotrigine and mesalazine) and two drugs in salt form (nicotinamide and losartan potassium) were chosen. We selected four non-volatile and viscous solvents as the model solvents including PEG 400, PG, NMP and choline chloride (ChCl)/PG deep eutectic solvent (DES) which was synthesized according to a reference [7]. As it has been explained in the previous section, we provided a residual of each drug powder in each mentioned viscous solvent. It was found that when the viscous residuals were washed with a volatile solvent such as ethanol, they can be easily dried in the ambient condition to give a dried solid powder that can be analyzed with XRD instrument. The XRD pattern for all investigated pharmaceuticals were recorded and given in Figures 1 and 2. As can be seen, the XRD patterns of raw pharmaceuticals

were similar to the equilibrated ones in the investigated solvents for each studied drug demonstrating their crystalline forms did not transform to amorphous or polymorphic form after saturation equilibrium in the viscous solvents and during the washing time. These results showed that the claim of washing with ethanol as a volatile solvent can be an effective method for compensation of limitation for providing XRD pattern in the viscose solvents. It should be said that in the initial studies, we used acetone either as a volatile solvent for washing, however, in some cases we observed the different XRD patterns in comparison with raw materials. As the same patterns were observed in washing with ethanol, it can be concluded that these phase changes in washing with acetone can be related to the conversion of pharmaceuticals to amorphous or polymorphic forms in the acetone. However, we do not guarantee that for other existing drugs, these polymorphic changes cannot be happen when washing with ethanol.

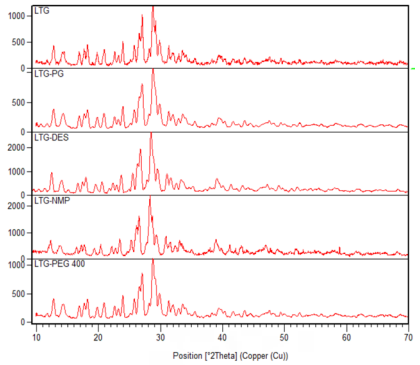


Figure 1A

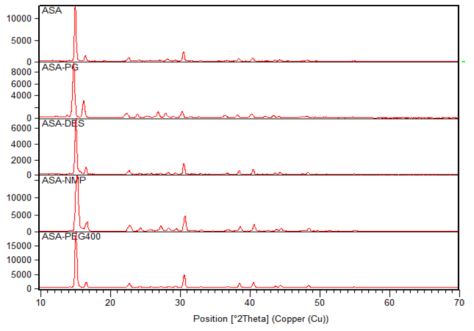


Figure 1 B

Figure 1. XRD pattern of lamotrigine (LTG) (A) and mesalazine (B) as base model' drugs in some viscous and non-volatile solvents.

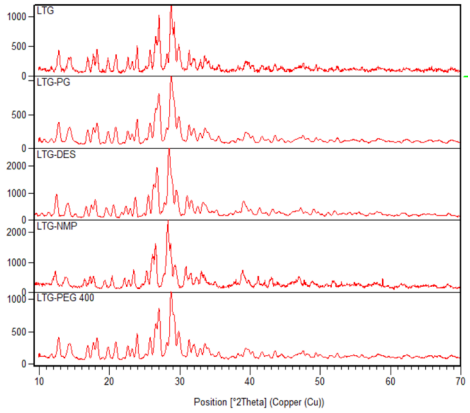


Figure 2A

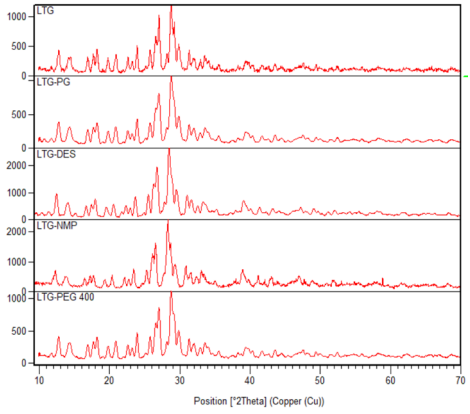


Figure 2B

Figure 2. XRD pattern of nicotinamide (NA, A) and losartan potassium (LP, B) as salt form model' drugs in some viscous and non-volatile solvents.

Conclusion

In this technical note, a fast technique has been proposed for washing the drug residuals equilibrated in some non-volatile and viscous solvents to reach a dried powder that can be easily analyzed by XRD. Although it is impossible we can test this method for all drugs, it is clear that in the investigated drug models and the viscous-non-volatile model solvents, with ethanol as washing solvent we reached satisfactory results that confirm the applicability of this technique.

Acknowledgments

This work was supported by Research Affairs of Tabriz University of Medical Sciences, under grant number 67824.

Credit authorship contribution statement

Elaheh Rahimpour: Investigation, Writing - original draft. Abolghasem Jouyban: Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. S. Byrn, R. Pfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg, G. Poochikian, Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations, *Pharmaceutical Research*, **12**, 945-954 (1995). https://doi.org/10.1023/A:1016241927429.

2. D. Braga, F. Grepioni, L. Maini, M. Polito, Crystal polymorphism and multiple crystal forms, in: Hosseini, M. (editor), *Molecular Networks*, Structure and Bonding, vol. 132, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 87-95. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01367-6_7

3. A.M. Healy, Z.A. Worku, D. Kumar, A.M. Madi, Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **117**, 25-46 (2017). https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.03.002.

4. Y.-T. Sohn, Effect of crystal form on bioavailability, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **34**, 443-452 (2004). https://doi.org/10.4333/KPS.2004.34.6.443

5. R. Censi, P. Di Martino, Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs, *Molecules*, **20**, 18759-18776 (2015). https://doi.org/10.3390/molecules201018759

6. A.S. Raw, M.S. Furness, D.S. Gill, R.C. Adams, F.O. Holcombe Jr, X.Y. Lawrence, Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 397-414 (2004). https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.011.

7. M. Rogošić, K.Z. Kučan, Deep eutectic solvent based on choline chloride and propylene glycol as a potential medium for extraction denitrification of hydrocarbon fuels, *Chemical Engineering Research and Design*, **161**, 45-57 (2020). https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.06.012.

How to cite this article

E. Rahimpour, A. Jouyban, A simple strategy for washing a recrystallized drug from viscous and non-volatile solvents prior to XRD study: A technical note, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*., **52**(1), 107-113 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109364

Artículo de revisión / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102588*

Dispersiones sólidas de solubilidad mejorada fabricadas en mezcladores de alto corte: una oportunidad para la industria farmacéutica local mexicana

Abigail Garcia-Radilla[1], Mariana Ortiz-Reynoso[1*], Jonnathan G. Santillán-Benítez[2], Edna T. Alcantara-Fierro[1]

[1]Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

[2]Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

*Autora de correspondencia: Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan, CP. 50120, Toluca, Estado de México. mortizr@uaemex.mx. Tel: 722 2175109/2173890.

Recibido: 15 de junio de 2022

Revisado: 23 de agosto de 2022

Aceptado: 30 de agosto de 2022

Resumen

Introducción: los fármacos clase II representan un alto porcentaje de las moléculas en fase de investigación biomédica. Este grupo atrajo la investigación en los últimos años, ya que su baja solubilidad acuosa condiciona su absorción *in vivo*, lo que plantea un reto para la tecnología farmacéutica. El diseño de dispersiones sólidas (SD) es una técnica que ha tenido éxito y se basa en la dispersión del fármaco en un acarreador polimérico, promoviendo el estado amorfo del primero. Uno de los métodos de obtención de SD es el de fusión, que se puede llevar a cabo en equipos sofisticados, pero los mezcladores de alto corte (HSM) también son una alternativa para obtener granulados por fusión. **Objetivo:** el objetivo de este trabajo es revisar si han sido reportados procesos de granulación por fusión utilizado HSM para la fabricación de SD y analizar las fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas de este equipo en dicho proceso. **Método:** en una metodología de revisión documental, se preseleccionaron 90 publicaciones de las bases de datos *PubMed*, *ScienceDirect* y *Google Scholar* de los últimos 20 años, de las cuales ocho describen el uso del método de granulación por fusión en HSM. **Resultados:** como resultados se vio que el 100% de estos casos reportó mayor solubilidad y velocidad de disolución que el fármaco puro. Se concluye que las empresas locales que cuentan con HSM tienen el potencial

para poner en marcha procesos de fabricación de SD exitosos en HSM, con la ventaja de no hacer una inversión adicional.

Palabras clave: Dispersiones sólidas, granulación por fusión, mezclador de alto corte, solubilidad, tecnología farmacéutica, SCB clase II.

Summary

Solid dispersions with improved solubility manufactured in high shear mixers: an opportunity for the local Mexican pharmaceutical industry

Introduction: class II drugs represent a high percentage of the molecules in the biomedical research phase. This group has attracted research in recent years, since its low aqueous solubility conditions its absorption in vivo, which poses a challenge for pharmaceutical technology. Solid dispersion design (SD) is a technique that has been successful and is based on the dispersion of the drug in a polymeric carrier, promoting the amorphous state of the former. One of the methods of obtaining SD is melting, which can be carried out in sophisticated equipment, but high shear mixers (HSM) are also an alternative to obtain granules by melting. **Aim:** the objective of this work is to review if melt granulation processes have been reported using HSM for the manufacture of SD and to analyze the strengths, weaknesses, opportunities and threats of this equipment in said process. **Method:** in a documentary review methodology, 90 publications from the PubMed, ScienceDirect and Google Scholar databases from the last 20 years were pre-selected, of which eight describe the use of the fusion granulation method in HSM. **Results:** as results, it was seen that 100% of these cases reported higher solubility and dissolution speed than the pure drug. It is concluded that local companies that have HSM have the potential to launch successful SD manufacturing processes in HSM, with the advantage of not making an additional investment.

Keywords: High shear mixer, melt granulation, pharmaceutic technology**,** solid dispersions, solubility, class II drugs.

Resumo

Dispersões sólidas com solubilidade melhorada fabricadas em misturadores de alto cisalhamento: uma oportunidade para a indústria farmacêutica mexicana local

Introdução: os medicamentos de classe II representam uma alta porcentagem das moléculas na fase de pesquisa biomédica. Esse grupo tem atraído pesquisas nos últimos anos, pois sua baixa solubilidade aquosa condiciona sua absorção in vivo, o que representa um desafio para a tecnologia farmacêutica. O desenho de dispersão sólida (SD) é uma técnica que tem obtido sucesso e se baseia na dispersão do fármaco em um carreador polimérico, promovendo o estado amorfo do primeiro. Um dos métodos de obtenção de DS é a fusão, que pode ser realizada em equipamentos sofisticados, mas misturadores de alto cisalhamento (HSM) também são uma alternativa para obtenção de grânulos por fusão. **Objetivo:** o objetivo deste trabalho é revisar se foram relatados processos de granulação por fusão usando HSM para a fabricação de SD e analisar os pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças desse equipamento no referido processo. **Método:** em uma metodologia de revisão documental, foram pré-selecionadas 90 publicações das bases de dados PubMed, ScienceDirect e Google Scholar dos últimos 20 anos, das quais oito descrevem o uso do método de granulação por fusão em HSM. **Resultados:** como resultados, foi visto que 100% desses casos relataram maior solubilidade e velocidade de dissolução do que o fármaco puro. Conclui-se que as empresas locais que possuem HSM têm potencial para lançar com sucesso processos de fabricação de SD em HSM, com a vantagem de não realizar um investimento adicional.

Palavras-chave: Misturador de alto cisalhamento, granulação por fusão, tecnologia farmacêutica, dispersões sólidas, solubilidade, fármacos de classe II.

Introducción

Los medicamentos son un recurso vital para llevar acabo un tratamiento paliativo, curación o prevención de enfermedades y síntomas. Pero si éstos no son formulados y administrados correctamente, el resultado es un riesgo para la salud individual y social. La innovación y las nuevas tecnologías en la industria farmacéutica en el mundo, aunque son necesarias para mejorar la salud, también representan importantes ahorros económicos.

La fabricación de medicamentos genéricos en laboratorios locales es una gran necesidad para que la población acceda a medicamentos de bajo costo. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) define un medicamento genérico como "un medicamento creado para ser igual a un medicamento de marca ya comercializado en forma de dosificación, seguridad, concentración, vía de administración, calidad, características de rendimiento y uso previsto" [1]. Un medicamento genérico garantiza que tiene la misma tasa de absorción que el medicamento innovador, con la ventaja de que los productos genéricos tienen un costo menor que su contra parte de patente de alrededor de un 80 y 85% menos.

La innovación y las nuevas tecnologías en la industria farmacéutica en el mundo son necesarias para promover nuevas estrategias comerciales obteniendo nuevos insumos y generar ahorros económicos. El estudio "*Valoración de la Industria Farmacéutica Basada en la Investigación en América Latina*", comisionado por la Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica (FIFARMA) y realizado por compañía IQVIA, mostró que el *impacto económico de la industria farmacéutica en América Latina es de cerca de $ 37 billones de dólares USD y 670.000 empleados.* Por cada dólar generado por la industria farmacéutica en Latinoamérica en el año 2019, se producen 75 centavos adicionales; asimismo, en los últimos cinco años se ha financiado un número de estudios clínicos (7.163) sin precedentes, *con inversiones de 1.1 billones de dólares; esto con la finalidad de proporcionar nuevos medicamentos que sean más efectivos que los existentes o que generen menos efectos secundarios, y que al mismo tiempo se logren reducir costos para los sistemas de salud y los pacientes [2].* El mercado central de laboratorios de la región de América Latina ha tenido un impacto de crecimiento desde el 2008 y uno de los factores que intensifica el aumento es la aparición de nuevos medicamentos [3].

La mayoría de los productos farmacéuticos, tanto los ya comercializados como los que están en fase de desarrollo, son formas farmacéuticas sólidas. Cerca del 40% de los 200 principales fármacos orales disponibles en los Estados Unidos de América (EEUA) y Europa son insolubles, y el conjunto de fármacos categorizados como moderadamente, ligeramente y poco solubles abarcan aproximadamente un 34% del universo. Además, el 75% de fármacos en fase de investigación presentan baja solubilidad, en parte debido a que *regularmente* los fármacos se encuentran en estado cristalino [4, 5]. La mejora de la solubilidad de los fármacos es una de las áreas de oportunidad en la innovación, en la que pueden incursionar las empresas locales, las cuales se dedican a la fabricación de medicamentos genéricos, para lo cual cuentan con equipos de fabricación de tecnologías factibles ampliamente conocidas. Recopilar datos de los equipos de sectores farmacéuticos locales es complejo ya que son datos confidenciales. Además, las empresas frecuentemente cambian sus nombres o pueden fracasar antes de aparecer en los registros, lo que

complica su rastreo, a diferencia de los equipos en posesión de espacios académicos, los cuales se pueden investigar a través de publicaciones científicas, la co-invención de patentes o por medio de patrocinios del gobierno ya que esta información es de uso público [6].

El objetivo de este trabajo es revisar si han sido reportados procesos de granulación por fusión utilizado HSM para la fabricación de SD a través de y una búsqueda bibliográfica. Asimismo se busca identificar las posibles aplicaciones de los HSM en la fabricación de dispersiones sólidas para evaluar la factibilidad de su implementación en la industria farmacéutica local, mediante un análisis de fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas (FODA), para justificar la implementación de la fabricación de SD en equipos actualmente disponibles en los laboratorios de países latinoamericanos. Con esto no sólo podrían mejorarse las propiedades biofarmacéuticas de principios activos con propiedades termodinámicas desfavorables (como es la baja solubilidad), sino también se abriría un camino para impulsar la industria local.

Fármacos poco solubles y el SCB

En los años noventa, Gordon Amidon publicó un famoso artículo titulado *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification*, introduciendo un Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (*BCS,* por sus siglas en inglés, *Biopharmaceutic Classification System*), que agrupa a las moléculas de los fármacos en cuatro categorías, de acuerdo a sus propiedades de solubilidad y permeabilidad, dos factores que están directamente relacionados con el proceso de absorción *in vivo* [7-9]. Derivado del trabajo de Amidon, la FDA publicó en 1997 la Guía para la Industria *Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata*, y en 2000 la primera versión de la Guía *Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para las formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata basadas en un sistema de clasificación biofarmacéutica* cuya versión de 2017 continúa vigente. El BCS es actualmente una guía imprescindible en la formulación de sólidos orales y se utiliza en algunos casos para justificar la exención de estudios *in vivo.* El BCS es una herramienta que ha resultado apta para incorporar cambios biofarmacéuticos, adecuándose a nuevos fármacos y nuevos sistemas de dosificación, como se ejemplifica en los tres casos siguientes.

El BCS ha ido evolucionando con el tiempo, adaptándose a nuevas formas farmacéuticas y a distintos contextos fisiológicos. Respecto al componente de solubilidad del BCS, el artículo original de Amidon deja abierta a la interpretación varios aspectos, como por que el tipo de disolución acuosa que se utiliza para las pruebas de disolución. El volumen de 250 ml originalmente propuesto para determinar la solubilidad (fundamentado en la cantidad de agua habitualmente usado para tomar los medicamentos), ha permanecido sin cambios desde 1995 [7]. Un ingrediente activo farmacéutico (API, por sus siglas en inglés, *Active Pharmaceutical Ingredient*)

es considerado de baja solubilidad cuando su dosis más alta dentro de un sistema sólido de liberación inmediata no es completamente soluble en 250 ml de un medio acuoso con un pH de 1,0 a 7,5, a 37 °C [10]. Las agencias regulatorias de cada región han indicado pequeñas acotaciones respecto de la forma de determinar la solubilidad, como por ejemplo los intervalos de pH a los que se debe realizar la prueba o el número de unidades necesarias para establecer la dosis más alta de un medicamento a solubilizarse en 250 mL [11-13]. Por lo que el campo científico ha hecho sugerencias de uniformar los criterios.

Sobre el componente del BCS de permeabilidad, en el 2005 Wu y Benet propusieron un sistema de clasificación complementario al BCS, denominado Sistema de Clasificación de la Disposición de Medicamentos Biofarmacéuticos (BDDCS, por sus siglas en inglés, *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*) [14], que pone énfasis en la permeabilidad de los fármacos, y es útil especialmente para aquéllos que presentan bajas tasas de permeabilidad celular, y que sin embargo muestran tasas absorción completas [15]. Además, se han estudiado otros componentes para la categorización de los API. En 2008 Benet, Amidon y otros colaboradores recomendaron que las agencias reguladoras añadieran el grado de metabolización del fármaco; ya que esté mantiene una interconexión entre la tasa de permeabilidad celular y el nivel de metabolismo, el cual especifica que, si el activo se elimina por metabolización, mantiene una alta permeabilidad, y por lo contrario si la eliminación del activo es por medio de excreción renal y biliar, se sugiere clasificarlo como fármaco de baja permeabilidad. Esto es un método alternativo para obtener una predicción de la biodisponibilidad *in vivo* para las cuatro clases, y es útil especialmente para incrementar el número de fármacos clase 1 aptos para una exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* [16]. En 2017 Vasconcelos *et al.* estudiaron la capacidad de los excipientes de actuar como potenciadores de la permeabilidad y propusieron un Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Excipientes (BCSE, por sus siglas en inglés, *Biopharmaceutical Classification System of Excipients*) [17]. La Figura 1 muestra la propuesta del BCS con la información complementaria de estos autores.

Para un mayor entendimiento de las implicaciones del BCS, hay que definir los términos "solubilidad", "solubilidad aparente", "disolución" y "velocidad de disolución". La solubilidad es la cantidad máxima de soluto que pasa a la solución (o se disuelve) cuando alcanza un equilibrio termodinámico y no cambia con el tiempo. En otras palabras, es la concentración de saturación. La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa el resultado de un punto final y depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del medio de disolución, tales como tamaño de partícula y área superficial del soluto, estructura del sólido (cristalino o amorfo), interacciones intermoleculares, polaridades, grado de ionización del soluto y solvente, pH,

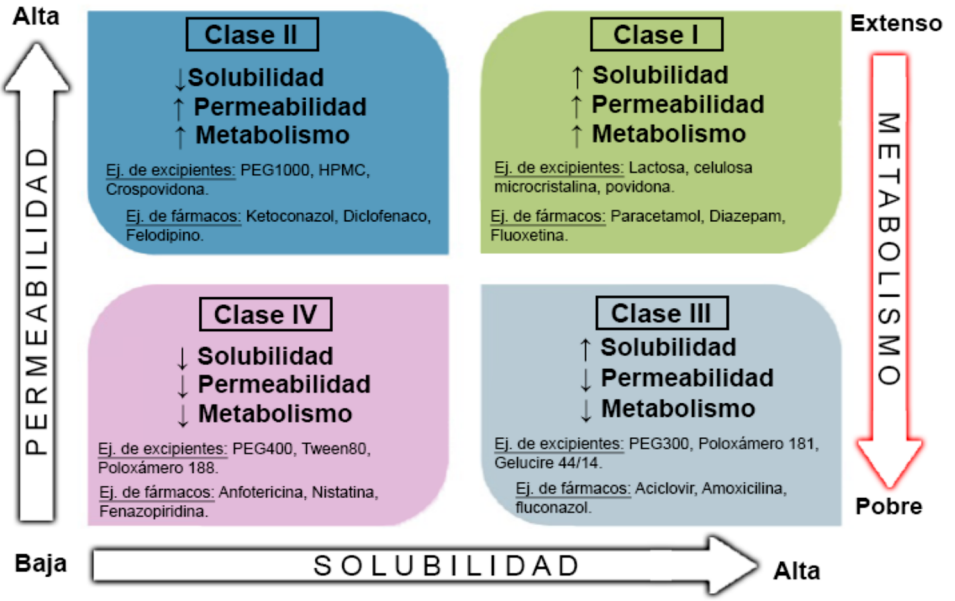


Figura 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Amidon *et al.* (7) modificada con información complementaria según lo propuesto por Wu y Benet (14) y Vasconcelos *et al.* [17].

temperatura y termodinámica de la disolución [18]. Cuando se alcanza una solución meta-estable entre soluto-solvente, se considera una "solubilidad aparente" [19]. La solubilidad es uno de los parámetros más importantes a considerar para alcanzar la concentración deseada del fármaco en la circulación sistémica. Es decir, las moléculas del API deben estar disueltas en los fluidos gastrointestinales (GI) en cantidades altas, como condición preliminar para atravesar las membranas celulares y llegar al sistema circulatorio; sólo tras la absorción se puede provocar la respuesta farmacológica [8]. La disolución es un proceso cinético de dispersión/disociación de un soluto en un disolvente para formar una solución, y la velocidad a la que este proceso se logra se denomina velocidad de disolución [18, 20, 21], y está descrita por la ecuación de Noyes-Whitney [22]:

$$\frac{dC}{dt} = k\,(Cs - C)$$

Donde:

dC/dt = Velocidad de disolución del fármaco ($kg{\cdot}s^{-1}$)
k = Constante

C_S = Concentración de saturación del fármaco (representa la solubilidad del compuesto, en kg o moles/L)

C = Concentración en la disolución a los diferentes tiempos (en kg o moles/L)

Cuando en el método se mantiene constantes el resto de los factores, como el área superficial, temperatura, velocidad de agitación, pH y fuerza iónica del medio de disolución, la disolución de una forma farmacéutica está influenciada por la solubilidad y la velocidad de disolución intrínseca del fármaco [23, 24]. La prueba de disolución**,** esta descrita en la farmacopea y se utilizan aparatos de dimensiones específicas y que mantiene constantes estos factores.

Conociendo los valores de solubilidad y velocidad de disolución intrínseca del API, los farmacéuticos buscan estrategias para mitigar los retos de formulación y obtener los perfiles de disolución *in vitro* y de absorción *in vivo* deseados. Generalmente las estrategias se basan en atacar la solubilidad del fármaco, para lo cual existe una variedad de tecnologías disponibles. Rodriguez-Aller y colaboradores categorizaron las estrategias de formulación, de acuerdo con la naturaleza de la modificación involucrada, en: químicas, físicas y de administración, considerando que éstas se pueden utilizar por separado o combinadas [5]. Es posible dividir dichas estrategias según el proceso de manufactura en que se pueden aplicar; esto condiciona asimismo el sitio de fabricación en el que son empleadas estas técnicas. Algunas competen exclusivamente a la industria farmoquímica, que es la que produce el API; otras son aptas para realizarse dentro de los laboratorios farmacéuticos, en donde se manufacturan los medicamentos. Por ejemplo, para lograr una mayor solubilidad aparente y una disolución más rápida de los fármacos, se puede alterar químicamente la molécula de fármaco (por ejemplo, diseñando una pro-droga, cambiando el contra-ion de la sal, generando co-cristales o seleccionando polimorfos meta-estables) [25-27] o bien modificar la composición química del medicamento (mediante un ajuste de pH, la adición de excipientes como cosolventes y tensoactivos o la formación de complejos de inclusión) [28-30]. De ambas alternativas, únicamente la segunda puede llevarse a cabo en un laboratorio farmacéutico. En cuanto a modificaciones físicas sencillas, una opción popular es disminuir el tamaño de partícula del API mediante un equipo de molienda. La tasa de disolución suele ser dependiente de la distribución del tamaño de partícula (PSD, por sus siglas en inglés, *Particle Size Distribution*) del fármaco, dado que ésta modifica la relación superficie-volumen de los sólidos multi-particulados. Al disminuir el tamaño particular, se aumenta el área de la superficie de contacto, incrementando la velocidad de disolución, por lo que incluso algunos proveedores de materias primas ofrecen fármacos en grado micronizado. La PSD altera además una variedad de propiedades físicas que impactan la *procesabilidad* de la fabricación del medicamento [31, 32]. La disminución

del tamaño particular a niveles nanométricos aumenta hasta 60 veces la $C_{máx}$, que es la concentración máxima de un medicamento en el torrente sanguíneo, y hasta 30 veces el área bajo la curva plasmática, en comparación con las formulaciones cristalinas de tamaño de partícula micrométrico [26]. Por último, existen formas farmacéuticas y de vía de administración, y ahí también se aprovecha el *expertise* de la industria farmacéutica. En la figura 2 se muestran las diferentes estrategias de formulación para mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles.

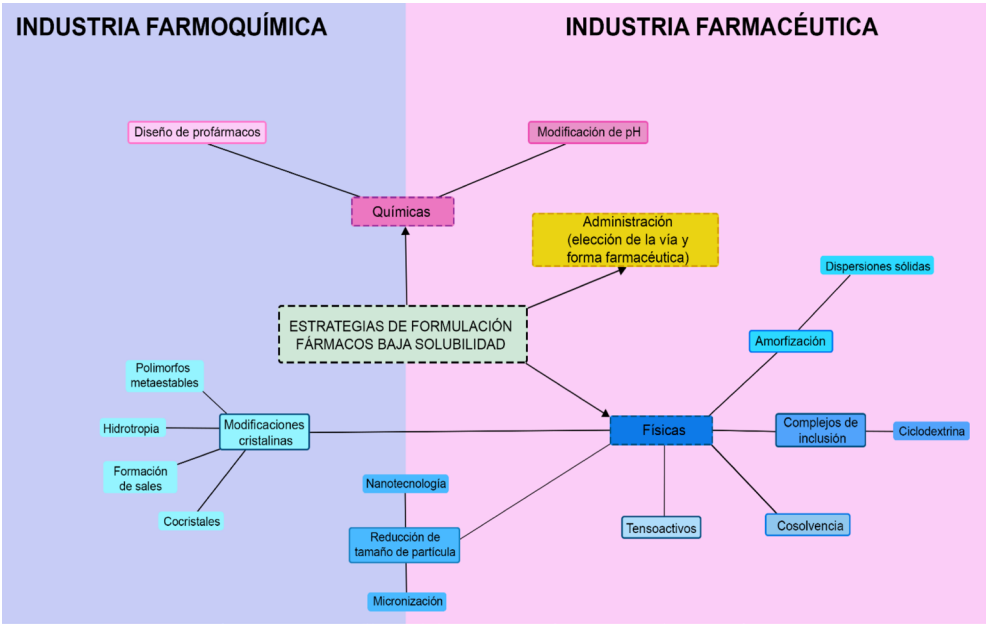


Figura 2. Representación esquemática de tres estrategias para mejorar la baja solubilidad de fármacos poco solubles en sistemas acuosos y su sitio de implementación y su lugar de aplicación. Fuente: Elaboración propia con información de [5].

Dispersiones sólidas

La elaboración de dispersiones sólidas (SD, por sus siglas en inglés, *Solid Dispersions*) es una estrategia innovadora para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de fármacos poco solubles en medios acuosos. La literatura científica muestra que la SD proporcionan una mejora significativa en diversos parámetros biofarmacéuticos [33], dado que favorecen una reducción del tamaño de partícula (obteniéndose una superficie de contacto ampliada) dado que el ingrediente activo se libera en finas partículas coloidales, en una SD amorfa aumenta la solubilidad porque el API sufre un cambio de la forma cristalina al estado amorfo de igual manera se pueden obtener partículas

con alta porosidad y humectabilidad mejorada gracias a la dispersión del fármaco en su forma amorfa en el polímero [34]. Las SD promueven una separación de las moléculas individuales del fármaco a través de las partículas del polímero, previniendo la precipitación del API dentro de la fórmula y tras el contacto con medio acuoso [33].

El primer intento de SD lo hicieron en 1961 Sekiguchi y Obi al diseñar el método de fusión; en este proceso se aplicó calor para fundir el sulfatiazol en urea, utilizando esta última como acarreador. Después se procedió con las operaciones de enfriamiento y pulverización. Los autores obtuvieron una mezcla en la que ambos componentes estaban íntimamente unidos y distribuidos homogéneamente. Actualmente a esto se le denomina dispersión sólida [35]; el término fue definido en 1971 por Chiou y Riegelman como: una dispersión homogénea de uno o más principios activos en un acarreador (portador o vehículo) hidrófilo o matriz inerte en estado sólido (típicamente azúcares solubles en agua, polímeros o emulsificantes de superficie activa) formado por moléculas con una conformación amorfa o cristalina [36-38]. Recientemente, los formuladores utilizan una mezcla de polímero y tensoactivo como sistema acarreador, lo cual es una alternativa para aumentar la solubilidad y velocidad de disolución del API poco soluble en agua. Esto ha llevado a que la SD se identifiquen en dos grupos: dispersiones sólidas binarias, formadas por el fármaco y el acarreador, y dispersiones sólidas ternarias, a las cuales se les incorpora un agente tensoactivo [37].

Clasificación de las dispersiones sólidas

Las dispersiones sólidas se pueden clasificar dependiendo del estado sólido del API y del acarreador (el cual puede ser cristalino o amorfo) (Fig. 3) y de la miscibilidad del fármaco [39, 40].

Primera generación

También son denominadas SD cristalinas. En éstas, un fármaco cristalino se dispersa en un acarreador cristalino formando una mezcla eutéctica o monotéctica; en una mezcla eutéctica, el punto de fusión de la mezcla está por debajo del punto de fusión de los componentes individuales (API y acarreador), mientras que en una mezcla monotéctica los puntos de fusión del API y el acarreador permanecen constantes [41-43]. Los polímeros que se utilizan generalmente son urea y azúcares; estos últimos presentan un punto de fusión alto, y por lo tanto no son adecuados para la preparación por el método de fusión [33]. Los polímeros cristalinos tienden a formar dispersiones más estables con el fármaco. Por lo tanto, son adecuadas para el almacenaje a largo plazo; sin embargo, tienen dos desventajas: que tienen una solubilidad limitada (es decir no son capaces de disolver grandes cantidades de fármaco en sí mismos) y que sus SD no son tan solubles como sus contrapartes amorfas [37, 40].

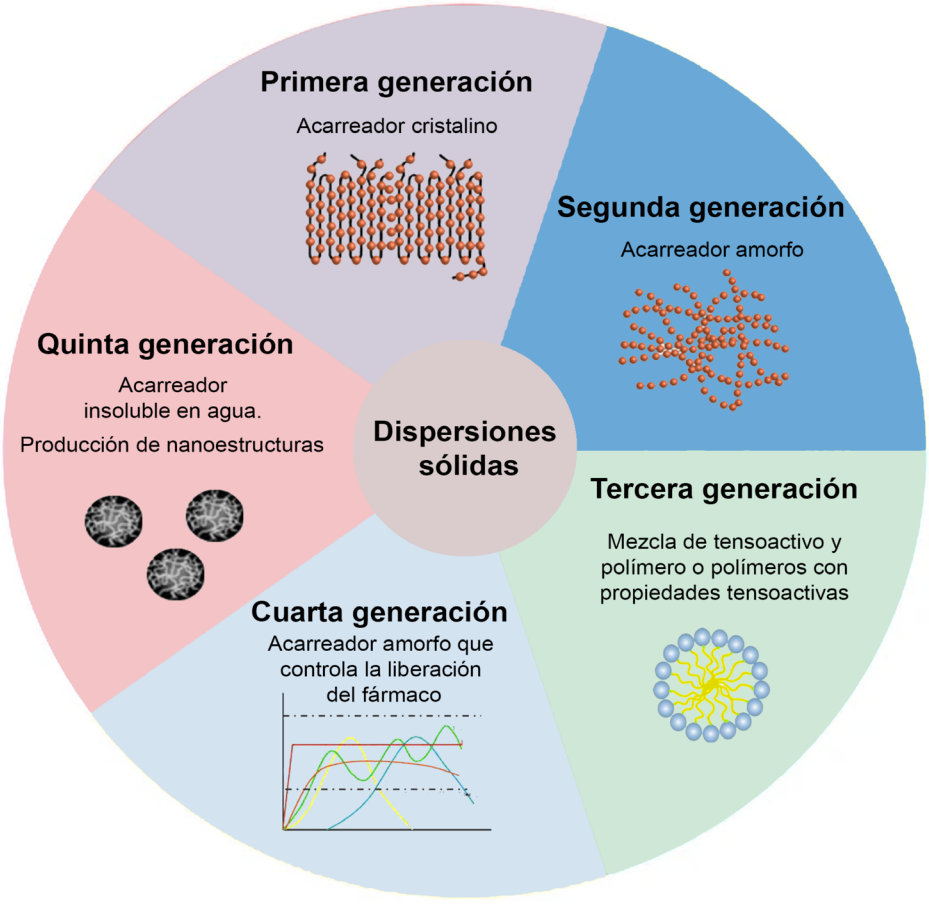


Figura 3. Clasificación de las dispersiones sólidas por sus componentes poliméricos. Fuente: Elaboración propia con información de [41].

Segunda generación

En estas SD, el fármaco está disperso molecularmente en forma irregular dentro de un acarreador amorfo que generalmente es un polímero. La distribución molecular del API en el polímero amorfo se puede dar de tres formas diferentes, dependiendo del método de preparación y la mezcla del fármaco-polímero:

Primera, denominada soluciones sólidas amorfas (o también dispersiones moleculares), es una distribución homogénea a nivel molecular, esto quiere decir que el ingrediente activo es miscible con el polímero y esto se distingue por un único valor de temperatura de transición vítrea (Tg, por sus siglas en inglés, *Glass Transition*) en la mezcla [44].

Segunda, también llamada suspensiones sólidas amorfas, no es una distribución homogénea a nivel molecular, de modo que el componente activo no es miscible. Por lo tanto, se tienen dos fases y se caracteriza por tener dos valores distintos de Tg: uno del fármaco y otro del polímero [44].

Tercera, es la combinación de las dos anteriores, en la cual se tienen dos fases, en una el API está distribuido homogéneamente a nivel molecular. Cuando la SD se expone a un medio acuoso, el acarreador se disuelve y el fármaco se libera como finas partículas coloidales [45].

Tercera generación

Se incorporan polímeros con propiedades tensoactivas o mezclas de polímeros y agentes tensoactivos o auto-emulsionantes como acarreadores. Esto mejora la estabilidad de la SD [46], evitando la precipitación y recristalización de los fármacos de la matriz polimérica durante el procesamiento o el almacenamiento. Estas dispersiones sólidas son capaces de mejorar la humectabilidad de los fármacos, debido a la saturación mediante la absorción en la capa externa de las partículas o por la formación de micelas [41, 42].

Cuarta generación

Esta generación la componen las dispersiones sólidas de liberación controlada (CRSDs, por sus siglas en inglés, *Controlled Release Solid Dispersions)*, y se utiliza para fármacos con vidas medias biológicas cortas que son poco solubles en agua. Debido al uso de polímeros hinchables o insolubles en agua, las CRSDs pueden liberar una cantidad conocida de fármaco por un periodo de tiempo prolongado [47], mejorando el cumplimiento del régimen de dosificación del medicamento en respuesta a la reducción de la frecuencia de dosificación. Otras ventajas propias de los sistemas de liberación modificada son la disminución de los efectos secundarios y el alargamiento de la concentración plasmática a niveles terapéuticos de fármacos poco solubles [48].

Quinta generación

Estas dispersiones sólidas se idearon para mejorar el rendimiento funcional del producto final, mediante la generación de estructuras de tamaños micro o nanométrico, proporcionando un rendimiento funcional programado y controlado del medicamento [41, 49]. Las partículas nanométricas aumentan en el orden de decenas de veces la solubilidad de las moléculas.

Fabricación de las dispersiones sólidas

Las dispersiones sólidas pueden prepararse en distintos equipos de fabricación, por medio de diferentes métodos, como la evaporación del solvente, la fusión o la combinación de ambos, como se muestra en la figura 4.

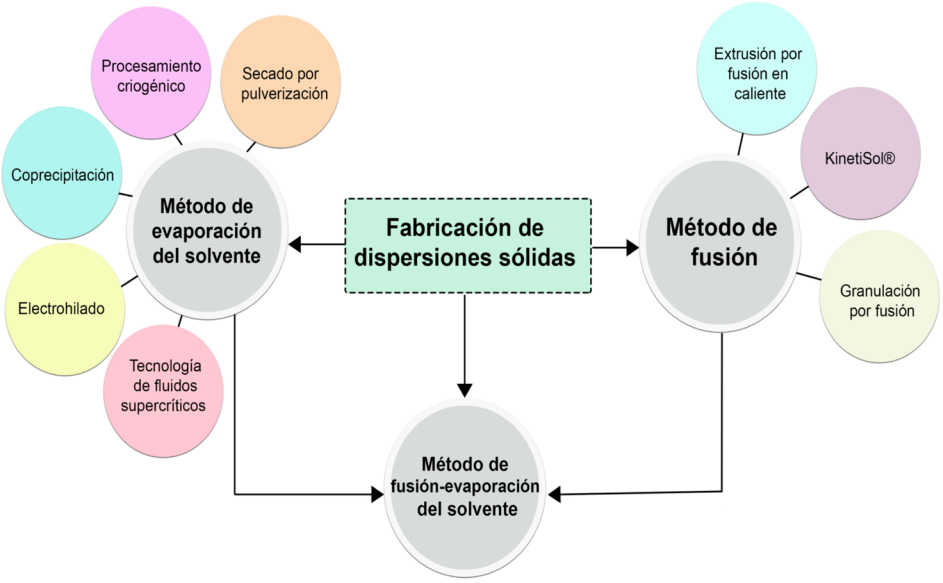


Figura 4. Métodos frecuentemente empleados en la fabricación de dispersiones sólidas. Fuente: Elaboración propia modificado de [50].

Método de evaporación del solvente

Este método consiste en la solubilización del fármaco y el acarreador en un solvente volátil común a ambos, que luego se elimina por evaporación a presión reducida a diferentes temperaturas. En este método, se puede prevenir la descomposición térmica de los fármacos y los acarreadores, ya que la evaporación de los solventes orgánicos ocurre a baja temperatura. Para realizar formulaciones con este método, es importante seleccionar una técnica de evaporación que produzca SD amorfas con niveles aceptables de solventes residuales, seleccionando de forma cuidadosa los polímeros, aditivos y solventes [50]. Encontrar un solvente no tóxico adecuado algunas veces es difícil, debido a que los acarreadores son hidrófilos, mientras que los fármacos son hidrófobos. Algunos tensoactivos se pueden utilizar para aumentar la solubilidad de los fármacos y acarreadores en los solventes. Sin embargo, las cantidades de los tensoactivos deben de ser muy pequeñas para que no se altere la estructura cristalina de la molécula acarreadora. Existen varias técnicas para mejorar el proceso de evaporación del solvente y generar SD estables [41]. Como por ejemplo el *secado por aspersión o pulverización,* ha sido la más estudiada a nivel de investigación [33, 51], *procesamiento criogénico, co-precipitación, electrohilado, tecnología de fluidos super críticos* [41, 50, 52].

Método de fusión

Esta técnica parte de dos materiales sólidos a temperatura ambiente. Consiste en suspender el fármaco en el acarreador previamente fundido, utilizando cualquiera de estas técnicas diferentes *Extrusión por fusión en caliente* (HME, por sus siglas en inglés, *Hot Melt Extrusión*) [33, 53], el *KinetiSol®* [50, 54] y *Granulación por fusión*; para generar una mezcla homogéneamente dispersa. Después del proceso de enfriamiento, se obtiene un sólido que se tritura, se tamiza o se pulveriza para reducir el tamaño de partícula, o bien se procesa mediante moldeo por inyección para desarrollar formas de dosificación adecuadas. Esta técnica sólo se puede aplicar cuando el fármaco y el acarreador son miscibles a la temperatura de calentamiento. Cuando no son compatibles, se observan dos fases líquidas o se genera una suspensión en la mezcla en caliente [41].

En este artículo nos vamos a centrar en el método de *Granulación por fusión,* esta metodología es adecuada para fármacos sensibles a la oxidación y a la hidrólisis, debido a que el oxígeno y la humedad pueden eliminarse durante el proceso. Dos de los equipos más empleados son el lecho fluido (FB, por sus siglas en inglés, *Fluid bed*) y el mezclador de alto corte.

Método de fusión-evaporación del solvente

Consiste en la combinación de las tecnologías a base de evaporación de solvente y fusión. Se utilizan varios equipos farmacéuticos convencionales, pero el más adecuado es el FB. Se preparan la SD disolviendo un fármaco en un solvente adecuado y luego se incorpora esta solución en un acarreador fundido, seguido de la eliminación del solvente por un método de secado y la consecuente solidificación. El estado sólido del fármaco precipitado en la SD puede verse afectado por el uso de solventes, por lo que pueden generarse polimorfos no deseados. La ventaja de este método es que la temperatura y los tiempos de mezclado son menores que en el método de fusión, con lo cual se protege al fármaco de la descomposición térmica, lo que hace que esta técnica sea más adecuada para moléculas de fármaco termolábiles [41].

Aplicaciones innovadoras de la granulación por fusión en mezcladores de alto corte en la fabricación de las dispersiones sólidas

Mezclador de alto corte

El mezclador de alto corte (*HSM*, por sus siglas en inglés *High Shear Mixer*), es un equipo que se utiliza para realizar la mezcla y granulación de polvos farmacéuticos en un solo paso y de forma rápida y eficaz. La granulación es la aglomeración (unión derivada de fuerzas intermoleculares) de partículas de polvo para generar un material

con mejores propiedades mecánicas. Estas estructuras de mayor tamaño mantienen su forma y son denominadas gránulos. Los gránulos exhiben mejores propiedades reológicas que los polvos, aumentando la compactabilidad y mejorando el flujo de los materiales, lo que facilita el llenado de cápsulas o de matrices para la compresión de tabletas.

En la industria farmacéutica, los mezcladores de alto corte se utilizan cotidianamente para fabricar granulados, para lo cual se incluye en la fórmula del medicamento un excipiente de tipo aglutinante que confiere propiedades cohesivas a los materiales multiparticulados, previniendo la segregación de éstos. Con una cantidad pequeña de aglutinante, se llega primero a un estado pendular, en el que las partículas se unen por la viscosidad del aglutinante y las interacciones moleculares de tipo fuerzas de Van der Waals dadas por la tensión interfacial. Al añadir más aglutinante, se obtiene un estado funicular, y si se sigue aumentando la cantidad del aglutinante, se llega al estado capilar, en el que el conjunto de partículas se mantiene unidas por fuerzas de puente capilar, desplazando el aire interpuesto. Si se agrega un exceso del agente aglutinante se rebasa el "punto de granulación", puesto que se conduce a un estado de suspensión no deseable en un proceso de granulación [55].

El HSM consta de un recipiente cerrado de acero inoxidable que contiene un impulsor principal (mezclador, generalmente formado por hélices de tres aspas) en el que dará lugar al mezclado y permitirá la formación del granulado en un solo paso. Las aspas giran a una alta velocidad, ajustable en el intervalo de 0 a 1500 rpm [56], y un cortador o *chopper* que gira a una velocidad de entre 0 y 3000 rpm, evitando la formación de grandes aglomerados [57]. El HSM puede estar provisto de una camisa calefactora, que trabaja a temperaturas relativamente bajas (50-80 °C) [58] pero que es suficiente para fundir algún componente de la fórmula. El equipo incluye una pistola de aspersión dirigida a la mezcla de ingredientes mediante la cual se asperja el líquido para aglutinar los polvos.

En la aplicación del HSM en la granulación por fusión, el acarreador actúa como un agente aglutinante que genera dispersiones sólidas amorfas. El proceso consiste en calentar una mezcla del componente activo, aglutinante o acarreador y otros excipientes a una temperatura igual o por encima del punto de fusión del aglutinante [41, 59].

Los mezcladores de alto corte se pueden aplicar para la fabricación de las dispersiones sólidas, aprovechando el hecho de que esta tecnología distribuye homogéneamente el API en cada unidad de volumen de los excipientes empleados. Cabe destacar que, al igual que la granulación convencional, el proceso de granulación por fusión se da en un solo paso [60]. La granulación por fusión en un mezclador de alto corte se inicia incorporando el API en estado sólido, seguido de la adición del polímero acarreador fundido (que tendrá también la función de aglutinante). Los componentes se mezclan por el impulsor principal, cuya la velocidad se va aumentando progresivamente para

obtener una distribución del agente aglutinante. El aumento de temperatura resulta en la fusión del aglutinante, provocando junto con la agitación de alto corte la unión íntima o molecular de las partículas. Durante el proceso, el *chopper* evita la formación de grandes granulados. El último paso es el proceso de enfriamiento [57, 61].

El proceso es versátil porque el acarreador puede adicionarse en tres formas: mediante una pistola de aspersión, pulverizado o previamente fundido (aglutinantes de bajo punto de fusión y baja Tg) (Fig. 5) junto con el resto de componentes de la mezcla. Generalmente se trabaja con sustancias de punto de fusión de 50 a 90 °C [58-62], dando lugar a la unión de las partículas sólidas en diferentes estados. Los aglutinantes que se utilizan en esta metodología pueden ser hidrofóbicos o hidrofílicos, lo cual definirá un atributo crítico de la disolución del ingrediente activo [41, 59]. Se producen dos modos diferentes de aglomeración de la masa fundida: coalescencia, donde dos o más partículas se unen para formar gránulos de mayor tamaño, e inmersión, cuando las partículas de polvo son sumergidas en un tamaño mayor de gota del aglutinante.

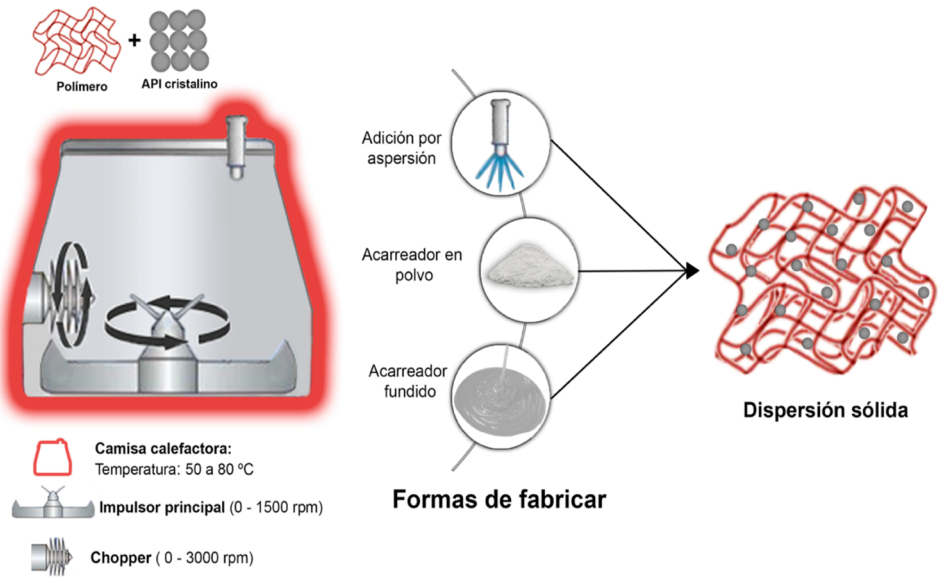


Figura 5. Representación esquemática de tres formas de fabricar dispersiones sólidas en un mezclador de alto corte. Fuente: Elaboración propia con información de [62].

Aspectos operativos de la fabricación de SD por el mezclador de alto corte

Los parámetros críticos en el mezclador de alto corte se muestran en la Fig. 6. El efecto de la carga del mezclador es importante; si se carga muy poco material en el contene-

dor, el movimiento de la masa no será homogéneo, lo que ocasiona un crecimiento descontrolado de aglomerados. Otros controles de proceso son el tiempo de duración del proceso (o residencia del material), la temperatura del producto, dada por la camisa calefactora, y las velocidades de rotación del impulsor y del *chopper*. En general, un aumento en la velocidad del impulsor genera un mayor tamaño medio de gránulo y una distribución de tamaño más acotada; también hay que considerar que la temperatura de la masa aumenta en parte debido al calor generado por la fricción intrínseca al proceso de mezclado de alto corte [56, 63].

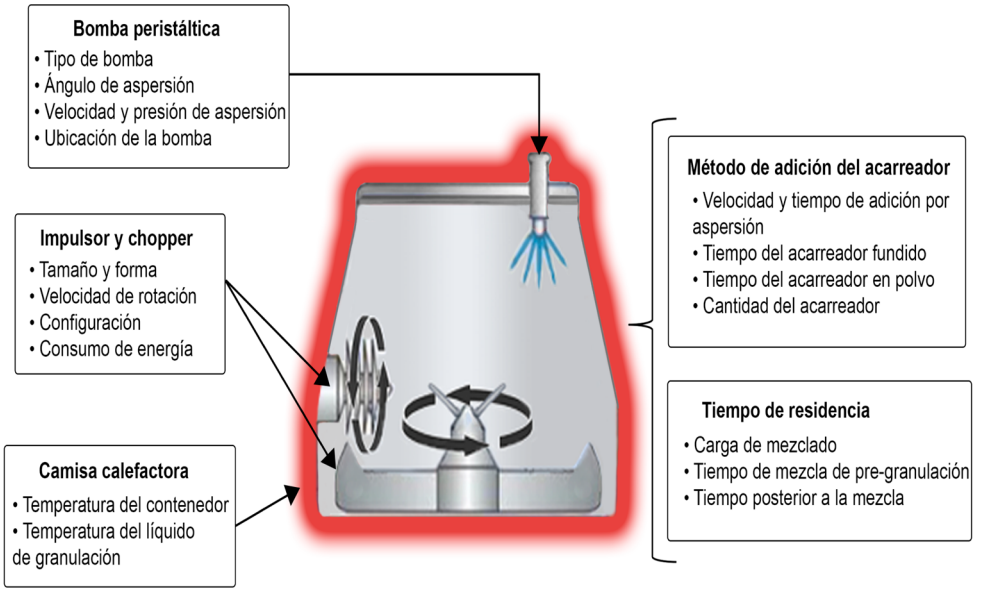


Figura 6. Parámetros críticos del proceso de un mezclador de alto corte. Fuente: Elaboración propia con información de [63].

Al fabricar una SD en un mezclador de alto corte, es crucial considerar que el producto final (medicamento) requiere de otros tipos y cantidades de excipientes. Las variables derivadas de la fórmula (tipo, cantidad, termoplasticidad, estabilidad térmica del polímero y la compatibilidad del API) son atributos críticos de calidad atribuibles a los materiales, que se tienen que tener en cuenta para el control de la nucleación y el crecimiento de los granulados [64]

Mediante el mismo proceso de manufactura se pueden formular gránulos de liberación inmediata o controlada [65], siendo la elección del acarreador polimérico el principal atributo crítico para la calidad del producto final. La elección del acarreador polimé-

rico es importante para obtener una SD eficaz y conlleva uno de los mayores desafíos para los formuladores, ya que influye en la preparación, estabilidad, biodisponibilidad y seguridad del medicamento [28].

Caracterización físico-química de los sistemas sólidos farmacéutico

La caracterización de granulados de SD obtenidos en el HSM se puede llevar a cabo por una variedad de técnicas analíticas que incluyen la evaluación de forma, distribución del tamaño de partícula, estado cristalino, análisis de superficie y pruebas de disolución, entre otras. La Figura 7 presenta un resumen de estas técnicas.

Análisis térmicos

Para determinar el estado sólido del fármaco en el sistema de dispersión y la miscibilidad del fármaco/polímero se utiliza la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés, *Differential Scanning Calorimetry)* para registrar los cambios de entalpía en cada evento térmico [73]. La miscibilidad homogénea de los componentes se observa en el termograma mediante un solo pico de Tg, y este valor se encuentra entre los valores de Tg de los compuestos individuales (aunque no siempre es concluyente, por eso es necesario complementar la caracterización de los gránulos con otras técnicas) [74, 75]. Mediante el pico correspondiente a la temperatura de fusión (Tm) en una mezcla física se puede distinguir el estado cristalino del fármaco, pero cuando se tienen dispersiones sólidas es característica la ausencia de este parámetro; esto es indicativo de que el API se encuentra en estado amorfo en la dispersión sólida [75]. Otra técnica que se puede usar es el análisis termogravimétrico que mide la pérdida o ganancia de masa cuando se somete a diferentes temperaturas; así puede verificarse el contenido de distintos materiales volátiles dentro de la muestra, e identificar polímeros [76].

Caracterización cristalográfica

La difracción de rayos X es la técnica analítica no destructiva más utilizada para la caracterización de sólidos cristalinos, ya sea en la modalidad de monocristal (un único cristal) utilizada para compuestos puros o de polvos (policristalino) para mezclas. Se utiliza con fines cuantitativos y cualitativos. Se determinan las posiciones atómicas, el tamaño de cristal y en la modalidad monocristal las dimensiones de las celdas unitarias [77] y en la modalidad de polvos, se identifican y cuantifican las fases cristalinas. En un sistema de SD se usa para identificar si el API se encuentra en estado cristalino o amorfo [78]. En un difractograma los picos representan el patrón de difracción de los cristales y la ausencia de éstos indica el estado amorfo del fármaco [79].

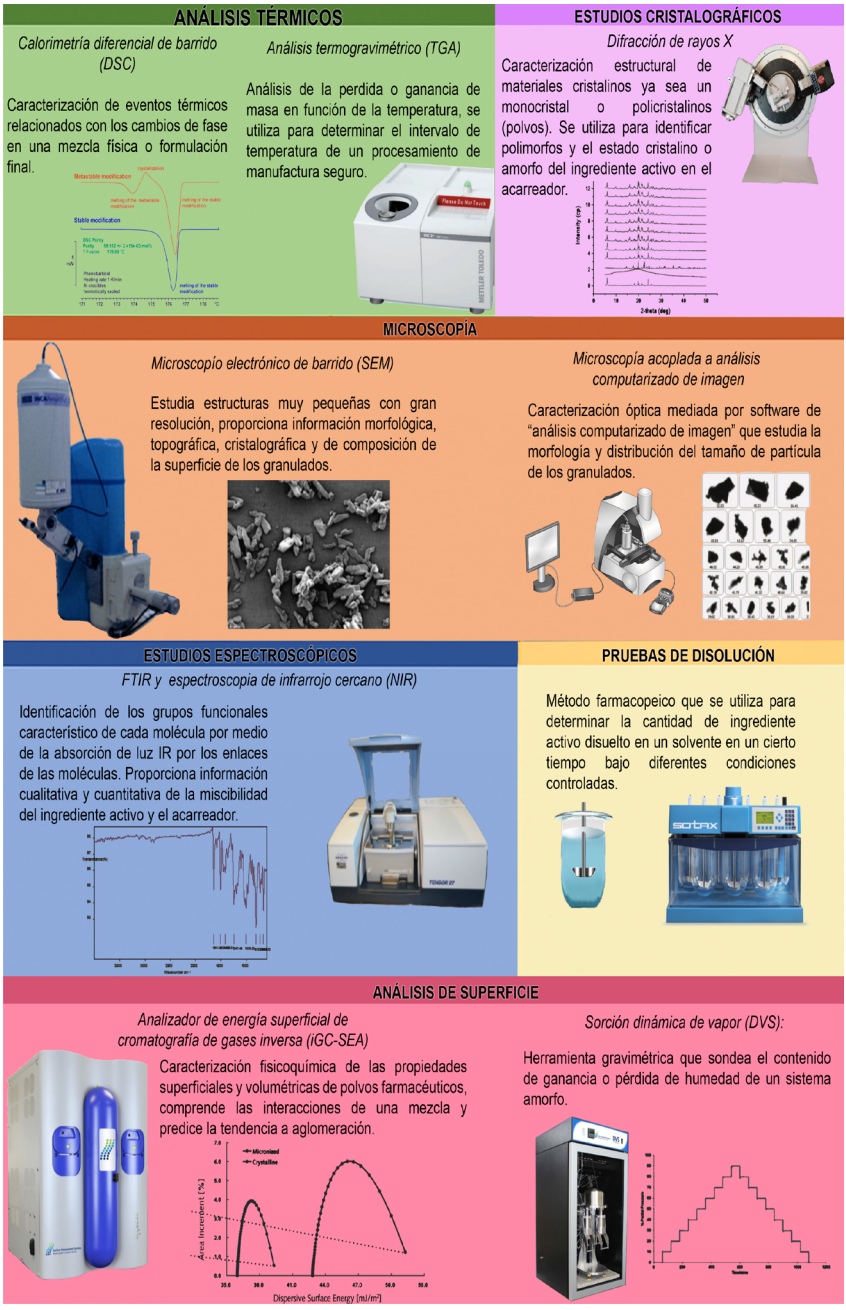


Figura 7. Técnicas de caracterización útiles para evaluar dispersiones sólidas. Fuente: Autoria propia, Laboratorio de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México con imágenes modificadas de [66-72].

Estudios espectroscópicos

Las técnicas de Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés, *Fourier Transform Infrared*) e infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés, *Near-Infrared*), se basan en los estados vibracionales que identifican los diferentes grupos funcionales que componen una molécula. Se utilizan para describir las posibles interacciones del fármaco y el polímero, y a través de ellas se identifica la aparición de nuevas interacciones químicas, como la formación de enlaces de hidrógeno entre el API-polímero. En el espectrograma se identifica la existencia de nuevos picos distintivos que no están presentes en los espectros individuales del fármaco y el polímero [76].

Caracterizaciones microscópicas

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscope*) permite visualizar y estudiar estructuras muy pequeñas gracias al gran aumento y alta resolución propios de esta técnica. Incluso la SEM proporciona información morfológica, topográfica y cristalográfica, y la composición y porosidad de los granulados [80]. Otro instrumento que se ocupa para caracterizar los sólidos farmacéuticos es el microscopio con el Análisis Computarizado de Imagen, que es un equipo automatizado provisto de videocámara y sistema informático para el registro, digitalización, almacenamiento y procesamiento de datos en cuanto a la distribución del tamaño y forma de las partículas. El equipo ideal para esta técnica es el Morphologi G3 de Malvern Panalytical [66].

Pruebas de disolución *in vitro*

Como se mencionó antes, la prueba de disolución es un método farmacopeico por el cual se cuantifica la cantidad del API disuelto o liberado en un solvente dado, en un tiempo determinado, bajo ciertas condiciones de experimentación. El análisis de la solubilidad del API presente en acarreadores poliméricos es un parámetro importante para la caracterización de los granulados. Existen diferentes aparatos para las pruebas de disolución utilizados, por lo que, dependiendo de la forma farmacéuticas a evaluar, se elige el más adecuad para medicamentos sólidos [81]. Algunos de los más usados son los aparatos USP I, II y IV, este último en la celda de polvos.

Análisis de superficie

El analizador de Energía Superficial de Cromatografía de Gases Inversa (iGC-SEA, por sus siglas en inglés, *Inverse Gas Chromatography- Surface Energy Analyzer*) determina una variedad de propiedades fisicoquímicas de superficie y volumen de muestras sólidas. Esta técnica analítica es simple, rápida y precisa, que proporciona información sobre permeabilidad, solubilidad, cinética de difusión y los parámetros de interacción termodiná-

mica, propiedades de adhesión y cohesión, área superficial especifica, calor y entropías de sorción, transiciones de fase (temperaturas de transición vítrea), isotermas de adsorción, mapeo de heterogeneidad de energía superficial, propiedades ácido-base; y energías superficiales dispersivas y polares. Asimismo, si se mide la tasa de cristalización de las dispersiones amorfas se pueden sugerir las condiciones de almacenamiento y el ciclo de vida de los productos farmacéuticos [82, 83]. El Sistema de Sorción Dinámica de Vapor (DVS, por sus siglas en inglés, *Dynamic Vapor Sorption)*, aporta información importante de sistemas amorfos, como: la movilidad molecular y parámetros térmicos (Tg, cristalización y termoporometría) y mide la cantidad, la cinética de la sorción de solvente por la muestra, cambiando la concentración de vapor que rodea la muestra y midiendo el cambio en la masa de la muestra en función del tiempo [82, 84].

Metodología

Fuentes de información

Se realizó una búsqueda bibliográfica por navegación en línea en las bases de datos PubMed (última consulta 10 de marzo 2022), ScienceDirect (última consulta 5 de febrero 2022), Google Scholar (última consulta 20 de diciembre 2021).

Criterios de inclusión:

- Fármacos modelo clase II del SCB que se hayan formulado como dispersiones sólidas.
- Dispersiones sólidas fabricadas en un mezclador de alto corte.
- Textos escritos en inglés y español.
- Publicaciones de editoriales reconocidas internacionalmente con un factor de impacto mínimo de 0.5 de acuerdo a lo reportado por la revista.

Criterios de exclusión:

- Estudios de fármacos de solubilidad mejorada no formulados como dispersiones sólidas.
- Artículos en los que no se utiliza el método de granulación por fusión en un mezclador de alto corte.

Estrategia de búsqueda

En las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Google Scholar las palabras de búsqueda que se consideraron fueron las siguientes: solid dispersions; melt granulation

technique; high shear granulator; high shear mixer; solid-state characterization; solubility enhancement; poorly water soluble drugs. Las publicaciones incluidas fueron desde el año 2000 hasta el año 2021.

El número total de estudios en esta revisión fue de noventa y uno. En doce de estos estudios, se obtuvieron SD mediante diferentes métodos. Ocho describen el uso del método de granulación por fusión en un mezclador de alto corte. Catorce estudios emplearon diferentes métodos para analizar el perfil de disolución evaluando así la funcionalidad de la dispersión sólida.

Proceso de selección y recopilación de datos

El conjunto de resultados que se encuentran en la tabla de este manuscrito se identificó como los estudios más importantes realizando la técnica de dispersiones sólidas en un mezclador de alto corte.

Resultados

Experiencias en la formulación de dispersiones sólidas mediante el método de granulación por fusión en mezcladores de alto corte

Se encontraron ocho artículos que cumplen los criterios de inclusión establecido, lo que indica que el método no se ha popularizado para la producción de SD. Sin embargo, los resultados publicados son alentadores en tanto describen la aplicación exitosa de los HSM a la fabricación de SD. A continuación, se revisan las publicaciones sobre las experiencias en la mejora de la velocidad de disolución y solubilidad de fármacos poco solubles que fueron procesados en un acarreador polimérico, utilizando un mezclador de alto corte como equipo para la obtención del sistema de dosificación. Los estudios demuestran la capacidad de esta técnica para generar formulaciones con una solubilidad mejorada.

Voinovich *et al.* (2000) [85] también de la Universidad de Trieste, buscaron obtener una formulación de teofilina de liberación sostenida utilizando lactosa anhidra como diluente y ácido esteárico como acarreador en un mezclador de alto corte. Hicieron pruebas variando la velocidad del rotor y el tiempo de mezclado para obtener diferentes tamaños de partícula. Con las formulaciones elaboradas, hicieron pruebas de velocidad de disolución (aparato USP I, 900 mL, 250 mg, 100 rpm, medio, 37 °C), encontrando que el mayor tamaño de partícula (2000 μm) liberaba más lentamente el fármaco a pH de 7,4 con una liberación del 50% en 3 horas y del 100% a 8,5 horas; los otros tamaños liberaron el fármaco más rápido (1250 μm: 100% en 5,5 hrs)

(800 μm: 100% en 4,5 hrs) (630 μm: 100% en 2,5 hrs). Optimizando el proceso para procurar la eficiencia más alta de un tamaño de partícula, los datos obtenidos fueron: velocidad del rotor 350 rpm y tiempo de mezclado de 21 min, obteniendo un rendimiento del 96% y al evaluar la forma de los gránulos observaron que éstos eran de una forma esférica bastante regular. Se analizó el tamaño de poro mediante la técnica de porosimetría de mercurio, observando que los poros pasaron de un tamaño de 18,39 mm^3/g a 707 mm^3/g después de la disolución, lo cual explica el mecanismo de liberación prolongada del fármaco. Mediante SEM, se observó que las partículas tenían una forma esférica regular y se verifico el tamaño de poro. Con los datos de tamaño de poro, forma de las partículas y velocidad de disolución se evaluaron diferentes modelos matemáticos de liberación, eligiendo el transporte de orden cero como el modelo que mejor explica la liberación a pH 7,4, mientras que a pH 1,2 se ajustó una difusión no Fickiana. Además, hicieron pruebas *in vivo* para analizar la concentración plasmática del fármaco en el tiempo, administrando cápsulas de 300 mg a cuatro pacientes sanos. Se observó que las Tmax (5.50 h) y $T_{1/2}$ (16,43 h) se comportan como formulaciones de liberación rápida, por lo que los autores especulan que esto podría deberse a un fenómeno flip-flop (cuando la tasa de absorción de un compuesto es significativamente más lenta que su tasa de eliminación), aunque debido al pequeño número de sujetos y a la variabilidad, los resultados fueron insuficientes. En conclusión, se realizó una formulación de liberación prolongada por el método de granulación por fusión en un HSM, obteniendo resultados satisfactorios después de la optimización del proceso a 350 rpm y 21 min de mezclado. El mezclador de alto corte permite un proceso de un solo paso y prescindir de una operación de recubrimiento pelicular. La fórmula optimizada fue suficiente para limitar la liberación *in vitro* del fármaco (de forma dependiente del tamaño de partícula). Además, se eliminó el uso de solventes, lo que resultó en un proceso para obtener gránulos de liberación sostenida más barato, más seguro, más amigable con el medio ambiente y más fácil de realizar [85].

Crowley *et al.* (2000) [86] en la universidad de Bradford en colaboración con AstraZeneca, evaluaron el uso de propanolol oleato (POA) como aglutinante en el método de granulación por fusión en un HSM compuesto de dos palas a una velocidad de 60 rpm, adaptada una camisa calefactora, con la finalidad de mejorar las propiedades de procesamiento del fármaco propranolol. El tamaño del lote fue de 31 g. Como primer paso se calentó la lactosa monohidratada a 65-70 °C operando el mezclador a 60 rpm. El POA (5-15% p/p) se calentó previamente a una temperatura de 70 °C y se vertió al mezclador; después de 4 minutos de amasado, el producto se colocó en un horno a 70 °C, pasándolo por un tamiz de 1410 μm. Por último, los gránulos se enfriaron a temperatura ambiente. Se separó por agitación de tamices una fracción

de tamaño de partícula de 355 a 500 μm. La evaluación de la morfología de los granulados se realizó por medio de SEM, demostrando que con una mayor concentración de POA se obtienen gránulos con mayor superficie. Tras resultados preliminares, agregaron 0.2% del tensioactivo laurilsulfato de sodio (SLS, por sus siglas en inglés, *sodium lauril sulphate*). Las pruebas de disolución USP en aparato II con 900 mL de solución buffer de fosfato (pH: 7,4) mostraron que se disminuyó de 25 a 2 minutos el tiempo para obtener el 90% del fármaco disuelto, comparando los gránulos con POA con el propranolol puro [86]. Al igual que otros trabajos, este demuestra que es posible mejorar la velocidad de disolución mediante la técnica de granulación por fusión en un HSM.

Passerini *et al.* (2002) [68] del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Bolonia, prepararon una SD de ibuprofeno, añadiendo lactosa como diluyente y poloxámero 188 (*Lutrol*® F68). Como acarreador hidrófilo fundible. Se utilizó un mezclador de alto corte a pequeña escala con un lote de 300 g, se usó una temperatura de 50 °C para la camisa calefactora y una velocidad para el impulsor de 500 rpm. Se obtuvieron partículas con tamaños desde los 200 a los 500 nm, con una carga de fármaco 10% mayor a la teórica (posiblemente debido a la pérdida del aglutinante en las paredes del contenedor). El proceso obtuvo un rendimiento del 91,1%. Interesantemente, el ibuprofeno se encontró de forma homogénea en toda la dispersión sólida. Mediante el uso de SEM se observó que las partículas no eran de forma esférica y que tenían una superficie rugosa, lo que se interpreta como una mayor relación de superficie y una humectabilidad mejorada. No se obtuvieron evidencias de la formación de cristales dentro de la formulación, lo que demuestra que el API se dispersó de forma correcta por la fuerte interacción de éste con el polímero. La velocidad de disolución aumentó con la formación de la SD, siendo de 74,5% en 10 min para la dispersión sólida, mientras que el fármaco puro sólo disuelve un 22,3%. Los análisis por la técnica de XRD demuestran que no hay cristales de ibuprofeno. Por lo tanto, se verificó que la mezcla es eutéctica debido a la fusión del fármaco con el polímero, siendo éste la principal razón del aumento en la velocidad de disolución del ibuprofeno. Las curvas del DSC evidenciaron interacciones entre el fármaco y los excipientes, permitiendo que el ibuprofeno se disperse de forma eficiente en la matriz de polímero. Estas interacciones en la mezcla eutéctica son responsables de mejorar la solubilidad del fármaco, y no sólo el cambio de la forma cristalina a la amorfa. Por último, se evaluó la estabilidad de los gránulos, y se verificó que éstos permanecían estables al menos por un año a 25 °C, manteniendo los mismos perfiles de disolución que los recién preparados [68].

Hamdani *et al.* (2002) [87] del laboratorio de Farmacia Galénica y Biofarmacia de la Universidad Libre de Bruselas, obtuvieron pellets de liberación prolongada con cua-

tro fármacos de diferentes solubilidades. Por un lado utilizaron clorhidrato de fenilefrina (un fármaco altamente soluble en agua) granulando este activo con lactosa de malla 450 y una mezcla de *Precirol®* y *Compritol® 888* (dos aglutinantes lipídicos). Por otro lado, fabricaron pellets de liberación sostenida con tres fármacos menos solubles: clorhidrato de ciprofloxacina, ketoprofeno y teofilina, mediante la pelletización por fusión en un mezclador de alto corte equipado con una camisa calefactora para mantener la temperatura alrededor de 45 ºC. En cada caso se ajustaron la velocidad del impulsor y del *chopper* variando en un intervalo de 0-4000 rpm, inyectando aire a través de la tapa del recipiente: los pellets fueron enfriados a temperatura ambiente. La composición de los pellets de clorhidrato de fenilefrina fue del 2% de fármaco, la mezcla de aglutinantes lipídicos a distintas concentraciones (18, 25, 40, 60 y 80%) empleando lactosa como diluente. Para los pellets de los fármacos de menor solubilidad, la composición fue 75% de fármaco, 15% *Precirol®* y 10% *Compritol® 888*. Se evaluó la distribución de tamaño de partícula mediante un análisis de siete tamices (700-1500 mm) en un aparato vibratorio. La evaluación de la morfología se hizo por SEM. Los pellets de clorhidrato de fenilefrina con 60% del aglutinante lipídico presentaron un mayor tamaño particular (1240 μm) y una morfología esférica, con una superficie más lisa. La cantidad de fármaco liberado se evaluó en un disolutor con aparato USP 2 (paletas) a un volumen de 600 ml a dos pH (1,5 y 7,0). A un pH 7,0 obtuvieron pellets de liberación prolongada en formulaciones con 25 y 40% de aglutinante; con el 60% de aglutinante se liberó alrededor de 85% del fármaco en 16 horas. De los pellets fabricados con 75 % de fármacos de baja solubilidad evaluados a un de pH 7 y un tiempo de 11 h, el ketoprofeno mostró una mayor liberación del fármaco (80%), seguido de teofilina y ciprofloxacino (aprox. 40%). El caso de pellets de ciprofloxacino analizados a pH de 1,5, liberaron menos del 10% del fármaco [87]. Este estudio demuestra la posibilidad de modular la velocidad de liberación de fármacos con el uso de acarreadores específicos mediante la tecnología de granulación por fusión en mezcladores de alto corte.

Rodriguez *et al.* (2002) [64] prepararon granulados mediante diferentes técnicas (granulación húmeda, fusión y con vapor) con el fin de evaluar si la granulación con vapor podría ser ventajosa para formulaciones de liberación inmediata. Eligiendo como fármaco modelo de baja solubilidad el diclofenaco al 10% y como acarreador polimérico el polietilenglicol (PEG) 4000 al 90%, utilizaron un HSM equipado con una camisa eléctrica como sistema de calentamiento con un volumen del recipiente de 2 L y lotes de 300 g. Mediante pruebas preliminares seleccionaron los parámetros del proceso. Para la granulación por vapor (50 ºC) y la granulación húmeda (25 ºC), el fármaco y el aglutinante se mezclaron en el HSM por 10 min (velocidad del impulsor 120 - 800 rpm), atomizando el líquido de granulación

(25 mL para la granulación húmeda y 12.3 mL para la granulación por vapor). Los gránulos se secaron a una temperatura de 50 °C en ambos métodos. Para el tercer método, la granulación por fusión, se mezcló el 50% del PEG 4000 con el fármaco, la parte restante se calentó por separado a 70 °C, cuando el HSM alcanzo la temperatura de 50 °C se adicionó el PEG fundido a una velocidad del impulsor de 800 rpm con un tiempo de amasado de 15 min. La distribución del tamaño de partícula se evaluó utilizando un agitador vibratorio, la fracción de 750-1500 μm fue utilizada para las evaluaciones posteriores. La morfología por la técnica de SEM arrojó que los granulados por el método de vapor tienen una forma más esférica y un área de superficie mayor (22,96 mm^2), comparados con las otras técnicas de fabricación. Los estudios con DSC y XRD confirmaron la transformación del fármaco en su forma cristalina a la amorfa en todas las muestras. En la prueba de disolución USP 24 en aparato II los gránulos obtenidos por el método de vapor presentaron una mayor velocidad de disolución, liberando más del 70% del fármaco en 10 min con respecto a los 60% de granulación por fusión y húmeda. Por lo tanto, estos datos sugieren que el uso del método de granulación por vapor en un HSM favorece una disolución mejorada, reduciendo la cantidad de agua necesaria para la fabricación, comparada con la granulación húmeda tradicional [64].

Seo *et al.* (2003) [88] de la Danish University of Pharmaceutical Sciences, aplicaron la granulación en un mezclador de alto corte para producir SD por el método de granulación por fusión, usando diazepam como fármaco modelo poco soluble y PEG 3000 y *Gelucire*® como acarreadores. Para determinar la cantidad óptima de diazepam, realizaron previamente un diagrama de fases con los datos obtenidos mediante una DSC, con ayuda del cual determinaron que las cantidades adecuadas de diazepam para formar soluciones sólidas fueron 15% de diazepam para PEG y 30% de diazepam para Gelucire®, mientras que para obtener una dispersión sólida bastó con 30% de diazepam para PEG y 40% de diazepam para Gelucire®. La velocidad del impulsor se llevó a 900 rpm para PEG y 1000 rpm para *Gelucire*®. La temperatura de trabajo para PEG fue un intervalo de 60 °C hasta 79 °C y de 85 °C para Gelucire, de acuerdo al diagrama de fases, aunque la temperatura final de la mezcla dependió también de la fricción en la fase. Se trabajó con un lote de 1500 g aproximadamente. Los granulados se caracterizaron en tamaño, forma y velocidad de disolución. Mediante SEM se analizaron las partículas obtenidas en las diferentes mezclas, encontrando que los granulados de *Gelucire*® tuvieron un diámetro menor y una PSD más acotado que las formulaciones con PEG; asimismo se observó que utilizar PEG ayudó a la generación de una forma de partícula más circular. Los granulados de PEG y de *Gelucire*® mejoraron significativamente la velocidad de disolución (aparato Erweka DT 70, 6,9 mg, 37 °C, 100 rpm, *buffer* de fosfatos 0,2 M, pH 6,8). Además, se observó

que, a mayores valores de la temperatura máxima del proceso, se generan gránulos con una mejor capacidad de disolución, y que el proceso de enfriamiento también altera este perfil, siendo más solubles aquellos granulados que se enfrían en nitrógeno líquido. La forma de la partícula resultó diferente dependiendo de la técnica usada para enfriar el producto; usando nitrógeno líquido se obtuvieron partículas menos esféricas, mientras que el enfriamiento por FB dio partículas más esféricas y con una PSD más angosta. Interesantemente, no fue necesario dispersar el diazepam en el acarreador previamente fundido antes de cargar el equipo, ya que el mezclado de alto corte es suficiente para alcanzar homogeneidad a las velocidades elegidas, lo cual resulta prometedor para el escalamiento del proceso. Una alternativa a este proceso consiste en pre-mezlcar los componentes mediante el método de bombeo. Otro hallazgo importante fue que la velocidad de disolución se controla principalmente mediante la selección del acarreador y depende en menor medida de los procesos de calentamiento o enfriamiento [88].

Perissutti *et al.* (2003) [89] del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Trieste, formularon una carbamazepina de liberación rápida utilizando PEG 4000 y lactosa monohidratada, mediante la técnica de granulación por fusión en un mezclador de alto corte. Además, evaluaron la capacidad de la crospovidona para mejorar la solubilidad de las distintas formulaciones. Para la preparación de los granulados se mezclaron en seco el API, la lactosa y/o la crospovidona durante 10 min a 100 rpm y 70 °C. Después, se añadió el PEG con agitación y se continuó la fase de mezclado durante 5 minutos más a 100 rpm. Durante la fase subsecuente de amasado, la velocidad del impulsor se elevó a 400 rpm durante 5 min. Al final del proceso de granulación, los gránulos se dejaron solidificar a temperatura ambiente extendiéndolos en capas delgadas sobre bandejas. Los gránulos enfriados se almacenaron en bolsas selladas durante 10 días; luego de esto se evaluó el estado cristalino del fármaco por la técnica de XRD de polvos, encontrando que el porcentaje de cristalinidad se redujo significativamente (aunque no desapareció) y que las formas polimórficas se mantuvieron sin cambios después del proceso de granulación por fusión. En los granulados obtenidos se detectaron tres eventos térmicos mediante DSC: la fusión de PEG, la deshidratación de la lactosa y la fusión del fármaco; también se observó que al añadir crospovidona a la mezcla, se incrementó la fluidez de los granulados, lo que indica un efecto positivo sobre las propiedades reológicas. La tasa de disolución del fármaco mostró una mejora *in vitro* en todos los granulados que se prepararon, desde 3,5 hasta 3,7 veces. Las diferentes cantidades de PEG usadas no mostraron diferencia significativa entre sí en la tasa de disolución. Con los granulados que mostraron propiedades de flujo favorables se comprimieron tabletas, lubricándolos con estearato de magnesio al

2%. En todos los casos se mostró buena uniformidad de masa. Las tabletas sin crospovidona intragranular no cumplieron con los tiempos de desintegración establecidos en la Farmacopea Europea; sin embargo, esto se solucionó añadiendo la crospovidona de forma extragranular [89].

Ye *et al.* (2007) [90] en los departamentos de Farmacia de China y Singapur, fabricaron pellets de itraconazol con el objetivo de mejorar su velocidad de disolución, utilizando el método de dispersiones sólidas. La preparación de la dispersión sólida se llevó a cabo mezclando el itraconazol con el acarreador polimérico Eudragit E100, mezclándolos en proporciones (fármaco:polímero) 1:2, 1:3 y 1:4 en una licuadora por 10 min. Posteriormente la mezcla se colocó en un recipiente de acero inoxidable y se calentó a 175 °C, enseguida enfriándola rápidamente colocando hielo en la superficie inferior del recipiente. El producto obtenido, la SD, se molió por 1 minuto y se tamizó, excluyendo las partículas mayores de 250 μm. La preparación de los pellets se llevó a cabo mezclando por 3 minutos el 30% de las dispersiones sólidas de itraconazol con 70% de celulosa microcristalina en un HSM a una velocidad del impulsor de 400 a 1000 rpm y manteniendo el *chopper* apagado. La masa total de cada lote de mezcla de SD de itraconazol con celulosa microcristalina fue de 100 g. Posteriormente, se agregó agua purificada como líquido aglutinante (55 mL mezclando por 5 minutos para obtener los pellets, mismos que se secaron a una temperatura de 40 °C. Se encontró que el prolongar el tiempo de amasado aumenta el tamaño de partícula en un intervalo de 679.3 - 913.5 μm. Las SD se evaluaron por DSC mostrando que en las proporciones mencionadas el punto endotérmico del itraconazol desaparece, sugiriendo que desaparece el estado cristalino del itraconazol, lo cual fue confirmado mediante patrones de difracción de rayos X. Para la prueba de disolución se utilizó un aparato USP II, en el cual se mostró que las dispersiones sólidas en las tres proporciones muestran una mayor velocidad de disolución comparada con el itraconazol puro, con más del 30% del fármaco liberado. Los pellets mostraron tener una disolución de más del 70% del fármaco en 45 minutos, comparado con menos del 1% del fármaco puro [90].

La tabla 1 recupera los resultados obtenidos de estos ocho trabajos publicados.

Análisis FODA de la aplicación del método de granulación por fusión en un mezclador de alto corte en la preparación de dispersiones sólidas

Para evaluar la factibilidad de la implementación de los HSM en la fabricación de SD en la industria farmacéutica, se realizó un análisis de Fortalezas, Oportunidades, Debi-

Tabla 1. Dispersiones sólidas obtenidas por el método de granulación por fusión en mezcladores de alto corte.

Autor	Forma farmacéutica y % de fármaco	% Aglutinante - acarreador	Otro excipiente (diluente)	Velocidad de amasado (rpm)	Temperatura de amasado (°C)	Tamaño de lote (g)	Tamaño de partícula (mm)	Impacto en la disolución
Voinovich *et al.* (2000) [85]	Pellets de liberación sostenida **Teofilina** 60%	Ácido esteárico 20%	Lactosa monohidratada malla 200 20 %	325-500	62	Sin datos	< 630-2000	50% en 3 horas[1]
Crowley *et al.* (2000) [86]	Gránulos de liberación inmediata Propranolol	Propranolol oleato 5-15%	Lactosa monohidratada 90-125 µm Tensioactivo SLS 0.2%	60	70	31	355-500	90% en 2 min
Passerini *et al.* (2002) [68]	Gránulos de liberación inmediata **Ibuprofeno** 10%	Poloxámero 188 23 %	Lactosa monohidratada (90% menos de 355 µm) 67%	500	50	300	200-750[2]	3.3x al minuto 10
Hamdani *et al.* (2002) [87]	Pellets de liberación prolongada **Fenilefrina** 2%	*Precirol*® + *Compritol*® 888 60%	Lactosa monohidratada malla 450	400-800	45	250	1240	Aprox. 85% en 16 hrs
	Pellets de liberación sostenida **Clorhidrato de ciprofloxacina, ketoprofeno y teofilina** 75%	*Precirol*® *15%* + *Compritol*® 888 10%		800-4000	50-55	250	Sin datos	Ketoprofeno 80% Ciprofloxacino y Teofilina aprox. 40% en 11 hrs.

Tabla 1. (*Continúa*)

Rodriguez *et al.* (2002) [64]	Gránulos de liberación inmediata **Diclofenaco** 10%	PEG 4000 90%	Sin datos	Método de vapor: 600-800 Método de fusión: 800	Ambos métodos 50	300	700-1500	Método de vapor 70% Método de fusión 60% Ambos en 10 min
Seo *et al.* (2003) [88]	Gránulos de liberación inmediata **Diazepam** 2.6 – 6.7 %	PEG 3000 17-17.50 % Gelucire 50/13 16.80 – 17%	Lactosa monohidratada malla 450 76.50 – 80%	900-1000	61.6 – 85.0	1500 aprox.	943 – 1242[3]	4.5x al minuto 15[4]
Perissutti *et al.* (2003) [89]	Gránulos de liberación inmediata[5] **Carbamazepina** 25%	PEG 4000 15-20% PEG 4000: Crospovidona 20:55 % 20:10 %	Lactosa monohidratada malla 200 45 – 60%	400	70	Sin datos	980 - 1500	3.5x - 3.7x al minuto 10
Ye *et al.* (2007) [90]	Pellets de liberación inmediata **Itraconazol**	Eudragit	Celulosa microcristalina 70%	400-1000	Sin datos	100	679,3-913,5	30%

[1]El perfil de liberación está en función del tamaño del pellet (dado por condiciones de proceso), aquí se reporta a las tres horas porque es el tiempo donde los autores toman en consideración un proceso óptimo.

[2]Se contempla la mayor fracción de los granulados.

[3]Se consideran aquí los tamaños de partícula del enfriamiento con nitrógeno, ya que los experimentos demostraron mejores resultados.

[4]Solo se recupera aquí el método de fusión para PEG300 y Gelucire 50/13.

[5]Posteriormente, realizaron tabletas para evaluar el potencial de comprimir granulados preparados por aglomeración en estado fundido.

lidades y Amenazas (FODA) con las dispersiones sólidas fabricadas en HSM a escala de laboratorio, como se muestra en la tabla 2 [55].

Tabla 2. Análisis FODA de la preparación de dispersiones sólidas por el método de granulación por fusión en HSM, según la revisión documental efectuada.

FORTALEZAS	DEBILIDADES
Puede prescindir del uso de solventes, eliminando la fase de secado y permitiendo que el proceso se dé en un solo paso. Esto se traduce en tiempos de producción reducidos y menor consumo energía [32]. Genera gránulos con mayor densidad (que procesos en lecho fluido, por ejemplo) [51]. Es un método de bajo costo y el equipo es accesible para mantenerlo en un laboratorio [33].	Posible recristalización de API durante el almacenamiento [37].
OPORTUNIDADES	**AMENAZAS**
Se obtienen sólidos amorfos con solubilidad mejorada [34]. Si se estandarizan los controles del proceso y las variables de entrada, el HSM hace posible la implementación de un proceso a escala industrial para la obtención de SD [91].	Al ser una aplicación nueva de un método conocido, no se tienen estudiados los efectos de los controles de proceso.

Las fortalezas importantes de esta tecnología son que: a) el proceso se desarrolla en un solo paso, b) se evita el uso de solventes (obteniendo un ahorro en el gasto de energético, menor tiempo de producción y reducción de residuos tóxicos) y c) se obtienen gránulos con mayor densidad en comparación con el equipo de lecho fluido [32]. Como oportunidades, está el hecho de que la literatura científica refiere que las dispersiones sólidas son una excelente estrategia para obtener sólidos amorfos. El método de HME actualmente es de los más utilizados en procesos de granulación y mezclado, pero no está popularizado, pues requiere de un equipo cuyo uso no está extendido en la mayoría de los laboratorios farmacéuticos, lo cual limita sus aplicaciones inmediatas para innovar procesos y productos, especialmente en las industrias locales o en las dedicadas a la producción de medicamentos genéricos en Latinoamérica. La HSM permite la implementación de un proceso a escala industrial para obtener SD. Una debilidad de la HSM (y de todos los métodos de fusión) es que existe la posibilidad de que el API se recristalice durante el almacenamiento [37]. Como amenaza encontramos que, al tratarse de una nueva aplicación de un equipo conocido, no se tienen estudiados a profundidad los efectos de controles del proceso y las variables de entrada.

Conclusiones

La baja solubilidad de los fármacos condiciona su absorción. La mayoría de las nuevas entidades químicas son poco solubles en disolventes acuosos, lo que ocasiona la baja biodisponibilidad de estos fármacos y por lo tanto la obstrucción del efecto terapéutico. Es posible potenciar las características biofarmacéuticas de los fármacos si se agrega más de un polímero y/o un tensoactivo en la fórmula. En la formulación de SD, es importante seleccionar correctamente polímeros que cumplan con las condiciones adecuadas. Se sugiere considerar acarreadores poliméricos hidrofílicos que sean amorfos y que tengan valores bajos de Tg, que permitan la dispersión del fármaco en su forma amorfa y que formen una dispersión monofásica. Además, es deseable añadir un agente tensoactivo para la formación de micelas, con el fin de permitir la formación de dispersiones sólidas amorfas novedosas y patentables, con un buen rendimiento.

La revisión de la bibliografía muestra que las SD fabricadas en HSM son un método exitoso para lograr que los fármacos clase II del BCS modifiquen sus propiedades fisicoquímicas de solubilidad y velocidad de disolución. En cuanto al proceso de fabricación, existe una amplia variedad de metodologías para la fabricación de las DS. Los HSM han sido utilizados exitosamente para fabricar DS por varios métodos, como la granulación por la vía húmeda, la evaporación de solvente y la fusión. El precedente en el uso de HSM en la industria farmacéutica para la granulación convencional supone una ventaja, porque elimina los costos de inversión en infraestructura derivados de la compra de equipos más sofisticados, como el extrusor por fusión en caliente o el lecho de secado por aspersión. Los HSM son una tecnología apta para implementar procesos de fabricación de SD, con una prospectiva útil en la implementación de procesos novedosos con tecnología disponible. En suma, la manufactura de dispersiones sólidas por el método de granulación por fusión en HSM representa una oportunidad para desarrollar medicamentos innovadores a costos reducidos y dosis adecuadas que tengan una biodisponibilidad mejorada a precios accesibles, lo que se traduce en una mejor calidad de vida del paciente a quien se lo prescriban.

En 1961 se propuso por vez primera la fabricación de SD, y su aplicación para la mejora de la velocidad de disolución sigue vigente. Los ocho artículos antes revisados reportaron la aplicación exitosa de los HSM en la producción de SD de solubilidad mejorada. Por ello proponemos que esta tecnología sea implementada en procesos de fabricación de formas farmacéuticas orales competitivas a nivel internacional, replanteando los alcances de los equipos disponibles en los países latinoamericanos. Las ventajas que presenta el HSM han sido demostradas, pero es necesario difundir y ampliar los casos de estudio de aplicaciones de los HSM en la fabricación de SD, para que éstas representen una alternativa de producción comercial interesante para la industria farmacéutica latinoamericana.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por la beca nacional otorgada, así como al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología del Estado de México por el apoyo financiero al proyecto de investigación Mujeres Científicas 2021.

Referencias

1. FDA, *Generic Drugs: Questions & Answers*, 2021. URL: https://www.fda.gov/drugs/questions-answers/generic-drugs-questions-answers#q1, consultado el 28 de marzo de 2022.

2. IQVIA, *Valuing the Research-based Pharmaceutical Industry in Latin America: assessing the economic & societal footprint*, 2021. URL: https://www.iqvia.com/-/media/iqvia/pdfs/institute-reports/valuing-the-research-based-pharmaceutical-industry-in-latin-america/iqvia-institute-valuing-the-research-based-pharmaceutical-industry-in-latam-11-21-forweb.pdf

3. K.I. Dhanya, *Key shifts in the Latin American Central Lab Market*, 2018. URL: https://www.clinicalleader.com/doc/key-shifts-in-the-latin-american-central-lab-market-0001, consultado el 29 de marzo de 2022.

4. L. Di, P.V. Fish, T. Mano, Bridging solubility between drug discovery and development, *Drug Discov. Today*, **17**(9-10), 486-495 (2012).

5. M. Rodriguez-Aller, D. Guillarme, J.L. Veuthey, R. Gurny, Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **30**, 342-351 (2015).

6. P. Clayton, M. Feldman, Academic teams and commercialization in the life sciences, *Front. Res. Metrics Anal.*, **6**(Sept.), 1-9 (2021).

7. G.L. Amidon, H. Lennernäs, 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**(3), 413-420 (1995).

8. R.A Bellantone, Fundamentals of Amorphous Systems: Thermodynamic Aspects, en: N. Shah, H. Sandhu, D. Choi, H. Chokshi, A. Malick (editoress), *Amorphous Solid Dispersions. Advances in Delivery Science and Technology*, Springer, New York (NY), 2014.

9. M.G. Papich, M.N. Martinez, Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) criteria to predict oral absorption of drugs in dogs: Challenges and pitfalls, *AAPS J.*, **17**(4), 948-964 (2015).

10. S. Alshehri, S.S. Imam, A. Hussain, M.A. Altamimi, N.K. Alruwaili, F. Alotaibi, A. Alanazi, F. Shakeel, Potential of solid dispersions to enhance solubility, bioavailability, and therapeutic efficacy of poorly water-soluble drugs: newer formulation techniques, current marketed scenario and patents, *Drug Deliv.*, **27**(1), 1625-1643 (2020).

11. WHO, *Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms*, WHO Technical Report Series 206AD (937), pp. 1-47.

12. S.H. Park, H.K. Choi, The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs, *Int. J. Pharm.*, **321**(1–2), 35-41 (2006).

13. V.P. Shah, G.L. Amidon, [G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and 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, 413-420, 1995-Backstory of BCS], *AAPS J.*, **16**(5), 894-898 (2014).

14. C.Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.*, **22**(1), 11-23 (2005).

15. L.Z. Benet, The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development, *J. Pharm. Sci.*, **102**(1), 34-42 (2013).

16. L.Z. Benet, G.L. Amidon, D.M. Barends, H. Lennernäs, J.E. Polli, V.P. Shah, S.A. Stavchansky, L.X. Yu, The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs, *Pharm. Res.*, **25**(3), 483-488 (2008).

17. T. Vasconcelos, S. Marques, B. Sarmento, The biopharmaceutical classification system of excipients, *Ther. Deliv.*, **8**(2), 65-78 (2017).

18. S.R. Byrn, G. Zografi, X.S. Chen, *Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*, Wiley, 2017, pp. 249-264.

19. M. Mosharraf, C. Nyström, Apparent solubility of drugs in partially crystalline systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29**(6), 603-622 (2003).

20. D. Mehtani, A. Seth, P. Sharma, R. Maheshwari, S.N. Abed, P.K. Deb, M.B. Chougule, R.K. Tekade, Dissolution profile consideration in pharmaceutical product development, en: R.K. Tekade, *Dosage Form Design Considerations*: Volume I, Elsevier Inc., 2018, pp. 287-336.

21. V.A. Gray, T.W. Rosanske, Dissolution, en: C.M. Riley, T.W. Rosanske, G. Reid (editors), *Specification of Drug Substances and Products*, Elsevier, 2020, pp. 481-503.

22. P. Costa, J. Sousa-Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations, *Dissolut. Technol.*, **16**(2), 41-46 (2009).

23. T.X. Viegas, R.U. Curatella, L.L. Van Winkle, G. Brinker, Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus, *Pharm. Technol. North Am.*, **25**(6), 44-53 (2001).

24. B. Shekunov, E.R. Montgomery, Theoretical analysis of drug dissolution: I. Solubility and intrinsic dissolution rate, *J. Pharm. Sci.*, **105**(9), 2685-2697 (2016).

25. J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, Prodrugs: Design and clinical applications, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7(3), 255-270 (2008).

26. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications, *Int. J. Pharm.*, **420**(1), 1-10 (2011).

27. N. Adawiyah, M. Moniruzzaman, S. Hawatulaila, M. Goto, Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems, *MedChemComm*, 7(10), 1881-1897 (2016).

28. A.M. Master, M.E. Rodriguez, M.E. Kenney, N.L. Oleinick, A.S. Gupta, Physical stability of salts of weak bases in the solid-state, *J. Pharm. Sci.*, **99**(5), 2386-2398 (2010).

29. S.V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, **453**(1), 167-180 (2013).

30. R. Nagarajan, E. Ruckenstein, Theory of surfactant self-assembly: A predictive molecular thermodynamic approach, *Langmuir*, **7**(12), 2934-2969 (1991).

31. B.Y. Shekunov, P. Chattopadhyay, H.H.Y. Tong, A.H.L. Chow, Particle size analysis in pharmaceutics: Principles, methods and applications, *Pharm. Res.*, **24**(2), 203-227 (2007).

32. N. Schultheiss, M. Roe, S.X.M. Boerrigter, Cocrystals of nutraceutical p-coumaric acid with caffeine and theophylline: Polymorphism and solid-state stability explored in detail using their crystal graphs, *CrystEngComm*, **13**(2), 611-619 (2011).

33. A.G. Cid, A. Simonazzi, S.D. Palma, J.M. Bermúdez, Solid dispersion technology as a strategy to improve the bioavailability of poorly soluble drugs, *Ther. Deliv.*, **10**(6), 363-382 (2019).

34. X. Zhang, H. Xing, Y. Zhao, Z. Ma, Pharmaceutical dispersion techniques for dissolution and bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs, *Pharmaceutics*, **10**(3), 74 (2018).

35. K. Sekiguchi, N. Obi, Studies on absorption of eutectic mixture. I. A Comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**(11), 866-872 (1961).

36. T.T.D. Tran, P.H.L. Tran, J. Lim, J.B. Park, S.K. Choi, B.J. Lee, Physicochemical principles of controlled release solid dispersion containing a poorly water-soluble drug, *Ther. Deliv.*, **1**(1), 51-62 (2010).

37. A.R. Nair, Y.D. Lakshman, V.S.K. Anand, K.S.N. Sree KSN, K. Bhat, S.J. Dengale, Overview of extensively employed polymeric carriers in solid dispersion technology, *AAPS PharmSciTech*, **21**(8), 309 (2020).

38. M. Slámová, T. Školáková, A. Školáková, J. Patera, P. Zámostný, Preparation of solid dispersions with respect to the dissolution rate of active substance, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **56**, 101518 (2020).

39. S. Janssens, G. Van den Mooter, Review: Physical chemistry of solid dispersions, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**(12), 1571-1586 (2009).

40. F. Meng, U. Gala, H. Chauhan, Classification of solid dispersions: Correlation to (I) stability and solubility (II) preparation and characterization techniques, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**(9), 1401-1415 (2015).

41. N.B. Jadav, A. Paradkar, Solid dispersions: Technologies used and future outlook, en: R. Shegokar (editor), *Nanopharmaceuticals: Volume 1: Expectations and Realities of Multifunctional Drug Delivery Systems*, Elsevier Inc., 2020, pp. 91-120.

42. A.R. Tekade, J.N. Yadav, A review on solid dispersion and carriers used therein for solubility enhancement of poorly water soluble drugs, *Adv. Pharm. Bull.*, **10**(3), 359-369 (2020).

43. C.L.N. Vo, C. Park, B.J. Lee, Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **85**(3 Part B), 799-813 (2013).

44. S.R.K. Vaka, M.M. Bommana, D. Desai, J. Djordjevic, W. Phuapradit, N. Shah, *Excipients for Amorphous Solid Dispersions*, Springer, New York (NY), 2014, pp. 123-161.

45. S. Sareen, L. Joseph, G. Mathew, Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion, *Int. J. Pharm. Investig.*, **2**(1), 12 (2012).

46. A.N. Ghebremeskel, C. Vemavarapu, M. Lodaya, Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: Stability testing of selected solid dispersions, *Pharm Res.*, **23**(8), 1928-1936 (2006).

47. D.K. Mishra, V. Dhote, A. Bhargava, D.K. Jain, P.K. Mishra, Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **5**(6), 552-565 (2015).

48. P.H.L. Tran, T.T.D. Tran, J.B. Park, B.J. Lee, Controlled release systems containing solid dispersions: Strategies and mechanisms, *Pharm. Res.*, **28**(10), 2353-2378 (2011).

49. D.G. Yu, J.J. Li, G.R. Williams, M. Zhao, Electrospun amorphous solid dispersions of poorly water-soluble drugs: A review, *J. Control. Release*, **292**, 91-110 (2018).

50. H. Sandhu, N. Shah, H. Chokshi, A.W. Malick, *Overview of Amorphous Solid Dispersion Technologies*, Springer, New York (NY), 2014, pp. 91-122.

51. M. Kidokoro, Y. Haramiishi, S. Sagasaki, T. Shimizu, Y. Yamamoto, Application of Fluidized Hot-Melt Granulation (FHMG) for the preparation of granules for tableting: Properties of granules and tablets prepared by FHMG, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **28**(1), 67-76 (2002).

52. S.H. Surasarang, R.O. Williams, Pharmaceutical cryogenic technologies, en: R.O. Williams III, A.B. Watts, D.A. Miller (editors), *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*, Springer Cham, 2016, pp. 527-607.

53. S. Sarabu, S. Bandari, V.R. Kallakunta, R. Tiwari, H. Patil, M.A. Repka, An update on the contribution of hot-melt extrusion technology to novel drug delivery in the twenty-first century: Part II, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **16**(6), 567-582 (2019).

54. D.J. Ellenberger, D.A. Miller, R.O. Williams, Expanding the application and formulation space of amorphous solid dispersions with KinetiSol®: A review, *AAPS PharmSciTech*, **19**(5), 1933-1956 (2018).

55. F. Bossler, E. Koos, Structure of particle networks in capillary suspensions with wetting and nonwetting fluids, *Langmuir*, **32**(6), 1489-1501 (2016).

56. T. Schæfer, B. Taagegaard, L.J. Thomsen, H. Gjelstrup-Kristensen, Melt pelletization in a high shear mixer. IV. Effects of process variables in a laboratory scale mixer, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1**(3), 125-131 (1993).

57. T. Schaefer, P. Holm, H.G. Kristensen, Melt granulation in a laboratory scale high shear mixer, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**(8), 1249-1277 (1990).

58. R. Gokhale, Y. Sun, A.J. Shukla, *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton (FL), 2005, pp. 191-228.

59. S. Shanmugam, Granulation techniques and technologies: Recent progresses, *BioImpacts*, **5**(1), 55-63 (2015).

60. F. Zhou, C. Vervaet, J.P. Remon, Influence of processing on the characteristics of matrix pellets based on microcrystalline waxes and starch derivatives, *Int. J. Pharm.*, **147**(1), 23-30 (1997).

61. T. Vilhelmsen, H. Eliasen, T. Schæfer, Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions, *Int. J. Pharm.*, **303**(1–2), 132-142 (2005).

62. P.C. Knight, T. Instone, J.M.K. Pearson, M.J. Hounslow, An investigation into the kinetics of liquid distribution and growth in high shear mixer agglomeration, *Powder Technol.*, **97**(3), 246-257 (1998).

63. L.X. Yu, G. Amidon, M.A. Khan, S.W. Hoag, J. Polli, G.K. Raju, J. Woodcock, Understanding pharmaceutical quality by design, *AAPS J.*, **16**(4), 771-783 (2014).

64. L. Rodriguez, C. Cavallari, N. Passerini, B. Albertini, M.L. González-Rodríguez, A. Fini, Preparation and characterization by morphological analysis of diclofenac/PEG 4000 granules obtained using three different techniques, *Int. J. Pharm.*, **242**(1–2), 285-289 (2002).

65. P. Flanders, G.A. Dyer, D. Jordan, The control of drug release from conventional melt granulation matrices, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **13**(6), 1001-1022 (1987).

66. Malvern Panalytical, *Morphologi G3 basic guide* (English). URL: https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0493EN

67. Mettler Toledo, *Thermal Analysis Excellence, DSC, Differential scanning calorimetry for unmatched performance*, 2015; URL: https://www.mt.com/dam/Analytical/ThermalAnalysi/TA-PDF/DSC3_Brochure_en_30247073A_V05.15_Original_38549.pdf

68. N. Passerini, B. Albertini, M.L. González-Rodríguez, C. Cavallari, L. Rodriguez, Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **15**(1), 71-78 (2002).

69. P. Papneja, M.K. Kataria, A. Bilandi, Formulation and evaluation of solid dispersion for dissolution enhancement of ketoconazole, *Eur. J. Pharm. Med. Res.*, **2**(5), 990-1014 (2015). URL: https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejpmr/article_issue/1441965998.pdf

70. Surface Measurement Systems, iGC-SEA, *Inverse Gas Chromatography Surface Energy Analyzer*, Product Brochure. URL: https://www.surfacemeasurementsystems.com/wp-content/uploads/2014/05/iGC-SEA-brochure-v1.4.pdf.

71. Surface Measurement Systems, DVS ADVENTURE, *Dynamic Gravimetric Water Vapor Sorption Analysis*, Product Brochure. URL: https://www.surfacemeasurementsystems.com/wp-content/uploads/2020/09/DVS_Adventure_E_Brochure.pdf

72. Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), UAEM-UNAM, *Difracción de Rayos X*. URL: http://cciqs.unam.mx/index.

php?option=com_content&view=article&id=105&Itemid=76, consultado el 22 de abril de 2022.

73. S.D. Clas, C.R. Dalton, B.C. Hancock, Differential scanning calorimetry: Applications in drug development, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **2**(8), 311-320 (1999).

74. F. Qian, J. Huang, Q. Zhu, R. Haddadin, J. Gawel, R. Garmise, R, M. Hussain, Is a distinctive single Tg a reliable indicator for the homogeneity of amorphous solid dispersion? *Int. J. Pharm.*, **395**(1–2), 232-235 (2010).

75. D. Medarević, J. Djuriš, P. Barmpalexis, K. Kachrimanis, S. Ibrić, Analytical and computational methods for the estimation of drug-polymer solubility and miscibility in solid dispersions development, *Pharmaceutics*, **11**(8), 372 (2019).

76. J. Djuris, I. Nikolakakis, S. Ibric, Z. Djuric, K. Kachrimanis, Preparation of carbamazepine-Soluplus® solid dispersions by hot-melt extrusion, and prediction of drug-polymer miscibility by thermodynamic model fitting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **84**(1), 228-237 (2013).

77. A.A. Bunaciu, E.G. Udriştioiu, H.Y. Aboul-Enein, X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **45**(4), 289-299 (2015).

78. A. Newman, D. Engers, S. Bates, I. Ivanisevic, R.C. Kelly, G. Zografi, Characterization of amorphous API:Polymer mixtures using X-Ray powder diffraction, *J. Pharm. Sci.*, **99**(5), 2386-2398 (2010).

79. J. Lu, K. Cuellar, N.I. Hammer, S. Jo, A. Gryczke, K. Kolter, N. Langley, M.A. Repka, Solid-state characterization of Felodipine-Soluplus amorphous solid dispersions, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **42**(3), 485-496 (2016).

80. A. Almeida, S. Possemiers, M.N. Boone, T. De Beer, T. Quinten, L. Van Hoorebeke, J.P. Remon, C. Vervaet, Ethylene vinyl acetate as matrix for oral sustained release dosage forms produced via hot-melt extrusion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**(2), 297-305 (2011).

81. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 12 ed., México, 2018.

82. S. Mohammadi-Jam, K.E. Waters, Inverse gas chromatography applications: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **212**, 21-44 (2014).

83. A. Pal, A. Kondor, S. Mitra, K. Thu, S. Harish, B.B. Saha, On surface energy and acid-base properties of highly porous parent and surface treated activated carbons using inverse gas chromatography, *J. Ind. Eng. Chem.*, **69**, 432-443 (2019).

84. C. Driemeier, F.M. Mendes, M.M. Oliveira, Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses, *Cellulose*, **19**(4), 1051-1063 (2012).

85. D. Voinovich, M. Moneghini, B. Perissutti, J. Filipovic-Grcic, I. Grabnar, Preparation in high-shear mixer of sustained-release pellets by melt pelletisation, *Int. J. Pharm.*, **203**(1-2), 235-244 (2000).

86. K.J. Crowley, R.T. Forbes, P. York, H. Nyqvist, O. Camber, Drug-fatty acid salt with wax-like properties employed as binder in melt granulation, *Int. J. Pharm.*, **211**(1-2), 9-17 (2000).

87. J. Hamdani, A.J. Moës, K. Amighi, Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process, *Int. J. Pharm.*, **245**(1-2), 167-177 (2002).

88. A. Seo, P. Holm, H.G. Kristensen, T. Schæfer, The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer, *Int. J. Pharm.*, **259**(1-2), 161-171 (2003).

89. B. Perissutti, F. Rubessa, M. Moneghini, D. Voinovich, Formulation design of carbamazepine fast-release tablets prepared by melt granulation technique, *Int. J. Pharm.*, **256**(1-2), 53-63 (2003).

90. G. Ye, S. Wang, P. Wan, S. Heng, L. Chen, C. Wang, Development and optimization of solid dispersion containing pellets of itraconazole prepared by high shear palletization, *Int. J. Pharm.*, **337**(1-2), 80-87 (2007).

91. P.J. Sirois, G.D. Craig, Scale-Up of a high-shear granulation process using a normalized impeller work parameter, *Pharm. Dev. Technol.*, **5**(3), 365-374 (2000).

Cómo citar este artículo

A. Garcia-Radilla, M. Ortiz-Reynoso, J.G. Santillán-Benítez, E.T. Alcantara-Fierro, Dispersiones sólidas de solubilidad mejorada fabricadas en mezcladores de alto corte: una oportunidad para la industria farmacéutica local mexicana, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 114-154 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102588

Artículo de revisión / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102840*

Análisis transversal de especies vegetales del sureste de México, en su uso para enfermedades cardiovasculares

Fimy Cristhel Narez Mendoza[a], Oswaldo Hernández Abreu[b*]

División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa KM. 1 Col. La Esmeralda CP. 86690. Cunduacán, Tabasco, México.

Correos electrónicos:

[a] 172a20056@alumno.ujat.mx

[b*] Autor de correspondencia: oswaldo.hernandez@ujat.mx

Recibido: 15 de junio de 2022

Revisado: 23 de agosto de 2022

Aceptado: 1 de septiembre de 2022

Resumen

Introducción: las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de trastornos que afectan el corazón y los vasos sanguíneos. El desarrollo de las ECV está asociado a factores de riesgo tales como edad, la herencia genética, falta de actividad física, tabaquismo, hipertensión arterial y dislipidemia. Por su alta prevalencia a nivel mundial, muchas personas recurren a las especies vegetales para tratar sus padecimientos relacionados con ECV, sin embargo, hay pocos documentos que contribuyan a relacionar los usos empíricos con investigación científica documentada. **Objetivo:** describir una revisión bibliográfica para llevar a cabo un análisis transversal entre el uso en la medicina tradicional y la validez científica de las especies usadas empíricamente en el tratamiento de las ECV. **Metodología:** se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de artículos publicados en bases de datos internacionales (ScienceDirect, Google Académico, PubMed, SciELO) de las especies usadas en la medicina tradicional del sureste de México para el tratamiento de padecimientos relacionados con ECV, utilizando las palabras clave "*cardiovascular disease, traditional medicine, Mexico*" Se incluyeron artículos con información del contenido metabólico y descripción de actividades farmacológicas, metodológica y estadísticamente documentadas y comprobadas. **Resultados:** se determinó que de un total de 20 especies vegetales sus principales usos son para la disminución de lípidos, hipertensión y prevención. Además, se integraron los estudios fitoquímicos y farmacoló-

gicos que sustentan y contribuyen con la investigación de productos naturales en la búsqueda de extractos y/o moléculas bioactivas. **Conclusión:** las especies vegetales representan una fuente de compuestos con potencial para el tratamiento de ECV. Es necesario que se continúe aportando estudios que puedan establecer nuevos tratamientos, que permitan actualizar el sector farmacéutico y de la salud.

Palabras clave: Enfermedades cardiovasculares, farmacognosia, fitoquímica, medicina tradicional.

Summary

Cross-sectional analysis of plant species from southeastern Mexico, in their use for cardiovascular diseases

Introduction: the cardiovascular diseases (CD) are disorders that affect the heart and blood vessels. The development of CD is associated with risk factors such as age, genetic inheritance, lack of physical activity, smoking, arterial hypertension and dyslipidemia. Due to its high incidence worldwide, many people turn to plant species to treat their CD-related ailments, however, there are few reports that contribute to linking empirical uses with scientific research. **Objective**: to describe the information in databases to make a cross-sectional analysis between folk medicine and scientific studies of plant species empirically used in the treatment of CD. **Methodology:** an exhaustive bibliographic review was carried out in manuscripts from international databases (ScienceDirect, Google Scholar, PubMed, SciELO) of the species used in traditional medicine of southeastern Mexico for the treatment of CD-related diseases. It was using key words as "*cardiovascular disease, traditional medicine, Mexico*" and was including search of the metabolic profile and pharmacology activities reported, methodologically and statistically proven. **Results:** it was determined that out of 20 plant species, their main uses are for lipid lowering, hypertension and cardiovascular prevention. In addition, phytochemical and pharmacological studies that support and contribute to the search for extracts and/or bioactive molecules from natural products were integrated. **Conclusion:** plant species represent a source of compounds with potential for the treatment of CD. It is necessary to continue providing studies that can establish new treatments, which allow modernizing the pharmaceutical area and health sector.

Keywords: Cardiovascular diseases, pharmacognosy, phytochemistry; traditional medicine.

Resumo

Análise transversal de espécies de plantas do sudeste do México, em seu uso para doenças cardiovasculares

Introdução: as doenças cardiovasculares (DC) são distúrbios que afetam o coração e os vasos sanguíneos. O desenvolvimento da DC está associado a fatores de risco como idade, herança genética, inatividade física, tabagismo, hipertensão arterial e dislipidemia. Devido à sua alta incidência em todo o mundo, muitas pessoas recorrem a espécies vegetais para tratar suas doenças relacionadas à DC, no entanto, existem poucos relatos que contribuam para vincular usos empíricos com pesquisas científicas. **Objetivo:** descrever as informações em bancos de dados para fazer uma análise transversal entre a medicina popular e os estudos científicos de espécies vegetais utilizadas empiricamente no tratamento da DC. **Metodologia:** foi realizada uma revisão bibliográfica exaustiva em manuscritos de bancos de dados internacionais (ScienceDirect, Google Scholar, PubMed, SciELO) das espécies utilizadas na medicina tradicional do sudeste do México para o tratamento de doenças relacionadas à DC. Ele estava usando palavras-chave como "doença cardiovascular, medicina tradicional, México" e estava incluindo a pesquisa do perfil metabólico e atividades farmacológicas relatadas, comprovadas metodológica e estatisticamente. **Resultados:** determinou-se que de 20 espécies de plantas, seus principais usos são para redução de lipídios, hipertensão e prevenção cardiovascular. Além disso, foram integrados estudos fitoquímicos e farmacológicos que subsidiam e contribuem para a busca de extratos e/ou moléculas bioativas de produtos naturais. **Conclusão:** As espécies vegetais representam uma fonte de compostos com potencial para o tratamento da DC. É necessário continuar a fornecer estudos que possam estabelecer novos tratamentos, que permitam modernizar a área farmacêutica e o setor da saúde.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares, farmacognosia, fitoquímica; Medicina tradicional.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) comprenden un grupo de trastornos que afectan el corazón y los vasos sanguíneos [1-3]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se manifiesta en forma de cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas, la cardiopatía reumática, las cardiopatías congénitas, las trombosis venosas profundas y las embolias pulmonares [3].

Las ECV siguen siendo la principal causa de mortalidad y discapacidad en la Región de las Américas, se estima que, en el año 2019, dos millones de personas murieron a causa de este tipo de enfermedad. [4]. Las ECV están asociadas con la presencia de factores de riesgo cardiovascular, que pueden dividirse en factores no modificables como son la edad, la herencia genética, diabetes y los factores que pueden ser modificados como el tabaquismo, la hipertensión arterial, las dislipidemias y la falta de actividad física [1, 2, 5-7]. Se ha descrito que el desarrollo de la aterosclerosis es el factor más importante porque es un denominador común en la fisiopatología de la ECV [8]. Esta condición se desarrolla por una descompensación del colesterol sérico, originado de un nivel elevado de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), que es la principal lipoproteína que transporta el colesterol en la sangre y el descenso el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) [9]. La evolución comprende fenómenos inmunológicos, procesos inflamatorios y disfunción endotelial, que termina con el desarrollo de la placa aterosclerótica, provocando así la disminución o ausencia del flujo sanguíneo por la estenosis de los vasos sanguíneos, dando origen a un mayor riesgo de sufrir un ataque al corazón [8-10]. La hipertensión arterial es otro importante factor de riesgo cardiovascular, ya que el riesgo cardiovascular aumenta progresivamente si aumentan los valores de la presión arterial sistólica y diastólica (≥ 130/80 mm Hg) [11]; el tratamiento de la hipertensión arterial se asocia con reducción del riesgo cardiovascular [12, 13]. Entre las alternativas para el control de las ECV se encuentra el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces, y accesibles a partir del aislamiento de compuestos de origen natural, que brinden mayor calidad de vida y disminuyan los efectos secundarios [14, 15].

La medicina tradicional mexicana sigue siendo muy empleada y conservada en toda la región del sureste de México, principalmente por grupos de comunidades indígenas que se encuentran en marginación y no cuentan con los servicios médicos, por lo que su única manera de adquirir un tratamiento para las enfermedades que padecen es acudir con algunas "*parteras, yerberos, curanderos o brujos*", personas que tienen un conocimiento profundo de la herbolaria, heredado de sus antepasados, y que por tanto, sirven como encargados de la salud en estas poblaciones, recetando infusiones, cocciones o algún tipo de preparado medicinal, sin necesariamente haberse demostrado científicamente el uso medicinal [16, 17].

Es por ello que, para contribuir a la validación científica sobre la efectividad de las plantas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, la presente investigación describe la relación de los aspectos más relevantes de las plantas que se usan en la región sureste de México en el control de los factores de riesgos cardiovasculares de manera empírica y sus estudios científicos fitoquímicos y farmacológicos.

Metodología

Se realizó una revisión de publicaciones en diversas bases de datos enfocadas en la etnobotánica del sureste de México. Se registraron los reportes que mencionaban la parte utilizada en la medicina tradicional y las enfermedades para las que se usaba la planta. Las enfermedades o padecimientos fueron todos aquellos que pudieran relacionarse con ECV como hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes y nombres populares, probablemente relacionados con ECV como *calentamiento de cabeza, espanto, mal aire*. Posteriormente, se necesitó conocer datos y evidencias científicas registradas para las plantas descritas; para ello se realizó una búsqueda en idioma español e inglés en las bases de datos PubMed del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Google Scholar, Scientific Electronic Library Online (SciELO) y ScienceDirect, utilizando las palabras clave *cardiovascular disease, traditional medicine, Mexico* . No se hizo restricción en la fecha de publicación, sin embargo, la bibliografía seleccionada corresponde a estudios publicados 5 años anteriores al 2021. Se incluyeron los artículos que describían el uso experimental de las especies vegetales en forma cruda, en extractos orgánicos y/o acuosos o de sus metabolitos secundarios, cualquier otro tipo de información fue excluida.

Análisis de datos. Una vez obtenido y seleccionado el material bibliográfico se hizo el conteo de las familias de especies vegetales más utilizadas en la medicina tradicional del sureste de México con actividad farmacológica demostrada; se recopiló la información para relacionar los usos en la medicina tradicional de las especies vegetales, su información existente del contenido metabólico, y las actividades farmacológicas demostradas experimentalmente en modelos *in vivo* e *in vitro* relacionadas con ECV.

Resultados

El uso de especies vegetales para tratar enfermedades es un hábito bastante común. Con base en la información recopilada, en el sureste de México se utilizan 26 especies vegetales tratar empíricamente algún factor de riesgo asociado a las ECV [16-20], de las cuales el 54 % se usa para el control de los lípidos séricos, el 31 % para tratar la hipertensión, el 8 % para tratar ambos factores y el 7 % para prevenir los ataques cardiacos.

Además, es de destacar que se tiene la presencia de 17 familias botánicas, siendo la Rutaceae con 4 especies la más representativa (figura 1). Las especies más importantes de esta familia son las que pertenecen al género *Citrus* y de las cuales ya se conocen que son fuente de antioxidantes, como polifenoles y vitamina C, que brindan efectos

protectores contra el daño del ADN, así como la capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [21, 22].

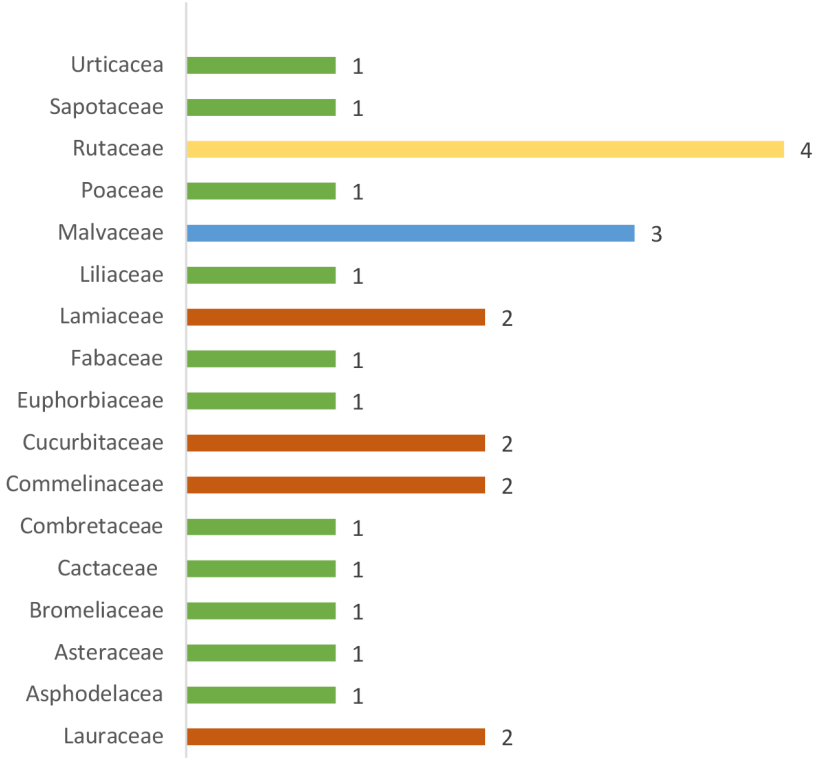


Figura 1. Distribución de especies por familia botánica usadas para las ECV.

Para las especies de *Aldama dentata* (Asteraceae) y *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Urticacea), no se encontró estudios que verifiquen su potencial terapéutico sobre las ECV. En el caso de *Inga jinicuil* Schlech (jinicuil), *Persea schiedeana* Nees (chinin), *Nopalea cochenillifera* (nopal) y *Pachira aquatica* Aubl (zapote de agua), no se encontró estudios fitoquímicos ni estudios farmacológicos que verifiquen las afirmaciones de su uso tradicional [16, 19].

En la tabla 1, se describe cada especie vegetal con la información farmacológica junto a la composición química y el uso tradicional al que se le asocia, basado en la literatura consultada. De acuerdo con la revisión de artículos científicos publicados en los últimos años, de las 26 especies vegetales, solo se encontró reporte de cribado fitoquímico y actividad biológica con potencial terapéutico para 20 de ellas.

Tabla 1. Especies de plantas medicinales usadas en enfermedades cardiovasculares (ECV)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Persea americana **(Lauraceae) -Aguacate**	Para reducir el colesterol, los triglicéridos, la presión alta [16]. Otros usos incluyen para tratar malestares gastrointestinales como diarrea, disentería e infección por parásitos intestinales [19].	Componentes bioactivos tales como: ácidos grasos: ácidos linoleico, oleico, palmítico, esteárico, linolénico, cáprico y mirístico [23], compuestos fenólicos y polifenólicos [24] como el ácido gálico, ácido elágico y ácido vanílico [25]. Además, ácidos hidroxibenzoico e hidrocinámico, rutina, resveratrol y cumarinas [26]. Fitosteroles: β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol [23, 25].	**Efecto cardioprotector:** La administración oral de 50, 100 y 150 mg/kg diarios del extracto acuoso de las hojas de *P. americana* a ratas con una dieta de un 8 % de cloruro de sodio, indujo efectos protectores contra el daño celular del corazón [27]. Los mecanismos por los cuales ejerce este efecto son la reducción de la presión arterial probablemente por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) [27, 28], la reducción de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) además de mejorar la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO) [27, 29]. **Actividad antihipertensiva:** El aceite de aguacate disminuyó la presión arterial en ratas con hipertensión inducidas por L-NAME, logrando un efecto similar al fármaco Losartán, por lo que se considera es capaz de reducir las acciones de Angiotensina-II [28]. En otro estudio el extracto acuoso a dosis de 150 mg/kg indujo una disminución sostenida de la presión arterial hasta por 24 horas [30]. Además, una combinación del extracto acuoso de *P. americana* con el extracto acuoso de *Annona muricata* produjo un efecto de sinergismo muy fuerte a dosis de 200 mg/kg en la hipertensión inducida por etanol/sacarosa [30]. **Efectos sobre el nivel de lípidos:** El extracto metanólico a dosis de 40 mg/kg redujo los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumentó los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) [25, 31].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Allium sativum* L. (Liliaceae) - Ajo**	Se usa para tratar diferentes enfermedades como la tiña, sarna, muelas picadas, tos, disminuir presión arterial, ataques corazón, tosferina y reumas [19].	Los constituyentes principalmente activos son alicina y ajoene [32]. El bulbo del ajo contiene *S*-alilcisteína, en el aceite esencial se encuentran principalmente compuestos sulfurados como trisulfuro de dialilo, disulfuro de metilalilo y trisulfuro de metilalilo [33, 34]. Los ácidos grasos principales son el linoleato de metilo y etilo; flavonoides, como la quercetina-3-D-galactósido y derivados del kaempferol [34].	**Protección cardiovascular:** el ajo en polvo puede reducir eficazmente la presión arterial y el colesterol total [32]. Además, se han descrito sus propiedades antidiabéticas lo que sugiere un candidato en el tratamiento del síndrome metabólico [35]. El potencial aterosclerótico del ajo también se debe a la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria por múltiples mecanismos, inhibir el engrosamiento de la íntima-media carotídea (cIMT), la actividad antioxidante, y la reducción en la oxidación de las LDL [36]. **Efecto cardioprotector:** El extracto acuoso a dosis de 0,05 % mostró capacidad para reducir el tamaño del infarto agudo al miocardio, además de disminuir la liberación de la enzima LDH en un corazón aislado de rata. El mecanismo principal se asocia con liberación de adenosina [37]. Recinella y colaboradores mostraron que el extracto hidroalcohólico del ajo (1, 10 y 100 µg/mL) ejerció efecto protector sobre miocitos cardiacos de manera independiente de la dosis al reducir el estrés oxidativo y la inflamación. El efecto antiinflamatorio es mediado por la inhibición de los niveles de prostaglandina (PG) E_2, 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ y la reducción del nivel de expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) [34]. **Actividad antihipertensiva:** Los resultados de un meta-análisis indicaron que los pacientes hipertensos tratados con preparaciones de ajo durante 8 y 12 semanas lograron una reducción en su presión arterial sistólica y diastólica de 6,71 y 4,79 mm Hg, respectivamente [38].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) - Albahaca**	Se utilizan las hojas para reducir la presión arterial [20]. Principalmente es usado para tratar enfermedades culturales tales como calentamiento de cabeza, espanto, mal aire [16]. Otros más lo usan en casos de calentura, irritación garganta, dolor de oído, dolor estómago, cólicos y diarrea [19].	El aceite esencial obtenido de las hojas de albahaca está constituido principalmente de linalol y el estragol, así como el *o*-cimeno, el citral, el alfa-pineno, el canfeno, el beta-pineno, el geraniol, el geranial, cinamato de metilo y eugenol [39]. β-elemeno, β-ocimeno, canfeno, carvacrol, α-bergamoteno y α-cadinol [40]. También contiene compuestos fenólicos, principalmente el ácido rosmarínico [41].	**Efecto cardioprotector:** Extracto etanólico de las partes áreas de *O. basilicum* a dosis de 20 y 40 mg/kg redujo la necrosis inducida por isoproterenol en ratas, mostró control sobre la presión arterial y mejoró el rendimiento del ventrículo izquierdo. Además, redujo la peroxidación lipídica que se le atribuye a su capacidad antioxidante (IC_{50}=22,24 μg/ml) [41]. En otro estudio la administración del extracto etanólico a dosis de 100-400 mg/kg durante 21 días en un modelo de ratones de coagulación sanguínea inducida por carragenina, demostró que la activación del sistema fibrinolítico funciona como efecto cardioprotector [42]. **Actividad antihipertensiva:** Un estudio dirigido por Umar y colaboradores demostraron que el extracto acuoso de *O. basilicum* a dosis de 100 mg/kg por día durante 4 semanas, redujo la redujo la presión arterial sistólica y diastólica en 20 y 15 mm Hg, respectivamente en ratas hipertensas renovasculares. La reducción de la presión arterial sigue siendo menor comparada con la del fármaco Captopril [43]. El extracto crudo de las hojas inhibió la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina 1 usando IC_{50} =64,99 μg/ml [44]. **Efecto sobre el nivel de lípidos:** El extracto acuoso a dosis de 5 g/100 g de peso corporal administrado a ratas hiperlipidemias, redujo los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL. Se observó que el efecto hipolipemiante fue mayor que el inducido por los fibratos [45].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Terminalia cattapa **L. (Combretaceae) – Almendro, Almendrón**	Las hojas son usadas para disminuir presión arterial, colesterol y nerviosismo [19].	El tallo y las hojas son fuentes de polifenoles de polifenoles, como los ácidos ferúlicos, la catequina y el ácido benzoico 2-prenilado [46], punicalagina, punicalina, terfluvina A y B, ácido chebúlico, cumárico, y sus derivados [47]. También contiene β-caroteno, ácido elágico, ácidos triterpénicos, especialmente ácido ursólico y sus derivados [47, 48].	**Actividad antihipertensiva:** La administración del extracto de hojas y de la corteza del tallo a dosis de 200 mg/kg por día disminuyeron la hipertensión y otras lesiones cardíacas en ratas estresadas por Ciclosporina A. El efecto en la reducción de la actividad de ECA, arginasa, acetilcolinesterasa (AChE), adenosina desaminasa (ADA) y la actividad mejorada del superóxido dismutasa (SOD) fue más eficaz que la administración de fármaco hipertensivo llamado Captopril [46].
Cnidoscolus chayamansa **(Euphorbiaceae) - Chaya**	Las hojas se emplean para reducir el colesterol y poca producción de leche materna [16]. Otros usos que se le da a esta planta, es para la diabetes, bajar de peso y fortalecer la sangre [19].	Los metabolitos significativamente activos son los grupos de alcaloides, flavonoides, taninos y cumarina [49]. Es fuente de glucósidos cianogénicos y compuestos fenólicos [50]. Se han aislado otros compuestos, el moretenol, el acetato de moretenilo, el kaempferol-3,7- dimetiléter y la 5-hidroxi-7-3′,4′-trimetoxiflavanona [51].	**Efecto cardioprotector:** García y colaboradores reportaron que administración del extracto etanólico de las hojas a dosis de 500 mg/kg vía oral, redujo en un 15 % el daño miocárdico en ratas sometidas a isquemia/reperfusión coronaria (I/R) y L-NAME [50]. **Efecto sobre el nivel de lípidos:** El extracto acuoso de las hojas a dosis de 500 mg/kg redujo el 31 % del colesterol en ratones sometidos a una dieta alta en colesterol, sin inhibir la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa [52].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Sechium edule* (Jacq.) Swartz (Cucurbitaceae) - Chayote**	Las hojas son usadas para controlar la presión arterial alta [16].	*Sechium edule* var. *nigrum spinosum* contiene compuestos bioactivos como cucurbitacinas, floridzina, naringenina, floretina, y compuestos fenólicos como el ácido gálico, clorogénico, vanílico, p-hidroxibenzoico, cafeico, p- cumarico [53]. También es fuente de glucósidos de luteolina, derivados de apigenina [54], éster metílico y derivados cinámicos [55].	**Actividad antihipertensiva:** Ensayo *in vivo*: en ratas vagotomizadas (bloqueo del nervio vago) con hipertensión inducida por angiotensina-II, la administración oral de 200 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de chayote disminuyó la presión arterial en 30 mm Hg [56]. Ensayo *in vitro*: estos mismos autores reportaron que usando una $EC_{50}=1,5 \times 10^{-8}$ M del extracto logró inhibir la contracción de la aorta provocada por incremento de Ca^{+}, creando así una respuesta vasorrelajante [55]. En otro ensayo *in vitro* en aortas de rata, el extracto acuoso de *S. edule* (EC_{50}=0,2 µg/ml, E_{max}=24,3 %) indujo un efecto vasodilatador inferior al 40 % respecto al efecto máximo de la Acetilcolina (control) de 79,8 % [56]. En comparación con el estudio de Lombardo y colaboradores [55], la diferencia de polaridad en los extractos determinó la concentración de compuestos polifenólicos, los cuales tienen actividades importantes sobre las enfermedades cardiovasculares. Trejo y colaboradores informaron que la fracción de acetona de un extracto hidroalcohólico de las raíces de la planta, administrado a dosis de 10 mg/kg, redujo la presión arterial y mostró control sobre el estado oxidativo e inflamatorio de ratas hipertensas con disfunción renal por Angiotensina II [57]. Los autores citados, coinciden en que el mecanismo de acción principal de *S. edule* se basa en actuar como antagonista competitivo de la Angiotensina II y posiblemente un efecto antagonista del calcio [55-57].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Manilkara zapota* var Royen (Sapotaceae) - Chicozapote**	Las hojas se usan para bajar los niveles de colesterol, además de ser empleada para bajar peso, inflamación y dolor de estómago [19].	Se ha identificado compuestos polifenólicos como quercitrina, miricetina-3-*O*-α-L-ramnósido, ácido gálico [58], ácido oleanólico, ácido cafeico y acetato de lupeol [59]. Otros compuestos tales como espinasterol, 6-hidroxiflavanona, (+) -dihidrokaempferol, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, taraxerol, taraxerona, ácido kójico y α-arbutina [60].	**Efecto sobre el nivel de los lípidos:** Un estudio dirigido por Barbalho y colaboradores [61] demostró que usando el jugo de las hojas y el jugo de la fruta de *M. zapota* como tratamiento en ratas alimentadas con el alimento comercial a voluntad, redujo los niveles de colesterol total y triglicéridos además de un incremento del c-HDL. En otro estudio se evaluó la actividad del compuesto activo miricitrina, donde a concentración de 100 μM, la sustancia redujo los niveles de LDL, TG y colesterol total y logró un aumento del c-HDL del 316.7 % respecto a las ratas hipercolesterolémicas no tratadas [62]. Además, el efecto aterosclerótico de la miricitrina se evidencia al mejorar la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y nivel del glutatión reducido (GSH) [62].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Momordica charantia **(Cucurbitaceae) – Cundeamor, amor seco**	Se usa para bajar los niveles de triglicéridos, pero también para diabetes, impotencia sexual [16] y afecciones de la piel como sarna, sarpullido, quemaduras y heridas [19].	Contiene triterpenoides, saponinas, polipéptidos, flavonoides, alcaloides y esteroles [63]. Los compuestos fenólicos tales como ácido cafeico, ácido gálico, ácido clorogénico [64], ácido quínico, ácido protocatecuico, ácido ascórbico, catequina, ácido siríngico, ácido 4-cumárico, miricetina, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido cumarico, ácido t-cinámico y ácido p-metoxibenzoico [65]. Además, kaempferol, catequina, epicatequina, ácido elágico, quercetina, isoquercitrina y rutina [66]	**Actividad antihipertensiva:** El extracto metanólico de las hojas redujo la presión arterial *in vitro*, mediante mecanismos de inhibición de la actividad de la ECA (IC_{50}= 109,63 µg/mL) y la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} y nitroprusiato de sodio a valores de IC_{50}=19,71 y 21,50 µg/mL, respectivamente [64]. **Efecto cardioprotector:** El extracto de las hojas a dosis de 200 mg/kg por vía oral, redujo la alta actividad de la ECA, además de la actividad de la arginasa, AChE y mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes, disminuyendo así la lesión de los tejidos cardíacos de las ratas sometidas a estrés por doxorrubicina [66]. **Efecto sobre el nivel de lípidos:** Saad y colaboradores reportaron que el tratamiento con *M. charantia* a 5 g/kg por vía oral durante 10 semanas redujo los niveles séricos de colesterol total, triglicéridos y glucosa. Además, mejoró la expresión de ARNm glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa y piruvato quinasa [67].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) – Guácimo, Cualote, hojas de espantano**	Se emplea para controlar la presión arterial alta. En infecciones de la piel, controlar la diabetes, dolor de estómago, disentería, diarrea y vómito [16, 19].	Se identificaron en la corteza del tallo y fruto compuestos fenólicos, especialmente proantocianidinas, agliconas y flavonoides glicosilados [68]. También flavonoides derivados de flavan-3-ol, taninos condensados [69]. Las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas bioactivas consisten principalmente en unidades de (-)-epicatequina [70].	**Efecto cardioprotector:** Los extractos acuosos del tallo y las hojas (IC_{50}=25,2 y 39,3 µg/mL, respectivamente), disminuyeron la peroxidación lipídica y la hemólisis inducida por doxorrubicina, disminuyendo la lisis de eritrocitos humanos y el contenido de MDA producido, de manera más eficiente que el Ácido Ascórbico [69]. En otro estudio, la fracción de procianidina administrada a dosis de 10 mg/kg por vía oral disminuyó la presión arterial sistólica y frecuencia en ratas. Además, redujo la contracción en anillos aórticos (IC_{50}= 101,3 ng/mL) en ratas hipertensas inducidas por norepinefrina [71]. Caballero y colaboradores reportaron que el ensayo *in vitro* de la fracción de n-butanol del extracto crudo (acetona 70%) y sus fracciones de proantocianidinas, a 100 µg/mL mostraron alta actividad para inhibir la unión de [^{3}H]-angiotensina II al receptor AT_1 humano [70].
***Citrus limon* L. (Rutaceae) - Limón**	Las hojas y el fruto son usadas para reducir la presión arterial, los niveles de colesterol y triglicéridos, tos, resfriado, diarrea y disentería [16, 19]	Los desechos de los cítricos contienen d-limoneno, flavonoides, carotenoides, fibras dietéticas, celulosa, hemicelulosa, pectina, polifenoles, ácido ascórbico, metano y aceites esenciales. Los componentes principales del aceite esencial son el acetato de linalilo, el linalol y d-limoneno [72]. Compuestos fenólicos como el cafeoil-*N*-triptófano, ácido hidroxicinamoil-*O*-glucósido, vicenina 2, eriocitrina, kaempferol-3-*O*-rutinosido y quercetina-3-rutinósido [73]. El aurapteno (7-geraniloxicumarina) es la preniloxicumarina principal del género *Citrus* [74]	**Efecto cardioprotector:** El extracto metanólico de la cáscara de *C. limon* demostró inhibición sobre la actividad de la ECA (IC_{50}=204,0 µg/mL), la fosfodiesterasa-5 (PDE-5) y las monoaminooxidasas (MAO) a valores de IC_{50}= 0,34 y 0,58 µg/mL, respectivamente [75]. Por lo tanto, esta especie fue capaz de prevenir el daño oxidativo del tejido cardiaco de rata y la peroxidación de lípidos inducida por Fe^{2+} [75].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Tradescantia spathacea* Swartz (Commelinaceae) – Maguey morado**	El maguey es una planta con múltiples usos en la medicina popular de Tabasco. Es usada para disminuir la presión arterial alta, en el tratamiento del tétanos y la tos [16]. Además de aliviar los cólicos menstruales y la inflamación y dolor por golpes, por citar algunos [16, 19, 20].	Taninos, terpenoides, esteroles, alcaloides, saponinas [76] y antocianinas, ejemplo de ella la rhoeonina [77]. La epigalocatequina y la rutina son los que exhiben mayor actividad [76].	**Actividad antioxidante y cardioprotectiva:** Bąkowska [78], reportó sus hallazgos, sobre que las antocianinas, han demostrado capacidad para eliminar las especies reactivas del oxígeno, para inhibir la oxidación de las lipoproteínas y al mismo tiempo la agregación plaquetaria. En otro estudio por González y colaboradores, la actividad antioxidante de *T. spathacea,* fue similar al del α-tocoferol y mayor que el del ácido ascórbico [79].
***Kalanchoe gastonis-bonnieri* (Crassulaceae) – Mala madre**	Inflamación del ovario, colesterol, dolor estomacal, dolor de cabeza, cáncer, diabetes y riñones [19, 20].	Del extracto de la hoja se han identificado componentes bioactivos: flavonoide quercetina 3-O-α ramnopiranósido-7-O-β-D glucopiranosil-(1→3)-α-L ramnopiranósido, así como vicenina-2, una C -glicosil flavona y derivados del ácido siríngico [80].	**Actividad antioxidante:** La quercetina muestra una fuerte actividad antioxidante al mantener el equilibrio oxidativo, mediante su efecto sobre el glutatión (GSH), las especies reactivas de oxígeno (ROS) causadas por factores ambientales y toxicológicos [81]. La aplicación de la terapia con quercetina en la isquemia/reperfusión renal (I/R) aumentó los niveles de GSH y redujo los niveles tisulares de malondialdehído (MDA) para la protección del tejido renal [82].
***Tradescantia zebrina* D.R. Hunt (Commelinaceae) - Matalí, cucaracha**	Es usada para bajar los niveles de colesterol, además de dolor de estómago, disentería, diurético, mal de orín y colitis [16, 19]	Las hojas y tallos contienen zebrinina y monodecafeoilzebrinina (antocianinas) [77, 83] y varios flavonoles. De la planta entera se han aislado varios glucósidos derivados de apigenina, luteína y otros flavonoides, así como taninos [83].	**Actividad antioxidante y cardioprotectiva:** Bąkowska [78], reportó sus hallazgos, sobre que las antocianinas, han demostrado capacidad para eliminar las especies reactivas del oxígeno, para inhibir la oxidación de las lipoproteínas y al mismo tiempo la agregación plaquetaria. El extracto metanólico, también demostró mayor actividad antioxidante durante los ensayos de eliminación de radicales libres y poder reductor férrico [84].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Citrus x sinensis (Rutaceae) – Naranja *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) – Naranja agria *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Rutaceae) - Naranja grey	Estas especies de Citrus se usan principalmente para disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos. Pero otros usos también incluyen para bajar de peso, en la mala digestión y el estreñimiento [16, 18, 19].	Los componentes principales del aceite esencial son el acetato de linalilo, el linalol y d-limoneno [72]. Compuestos fenólicos como el cafeoil N-triptófano, ácido hidroxicinamoil-o-glucósido, vicenina 2, eriocitrina, kaempferol-3-O-rutinosido y quercetina-3-rutinósido [73]. También flavonoides, como diosmina, luteína, obacunona, isoquercitrina, hesperidina, didimina, eriocitrina, neocriocitrina, narirutina, naringina, neohesperidina y 7-OH flavonona [85]. El aurapteno (7-geraniloxicumarina) es la preniloxicumarina principal del género *Citrus* [74].	**Efecto cardioprotector:** El extracto de la cáscara de *C. sinensis* a una dosis de 25 mg/kg mostró eficacia y seguridad al disminuir la peroxidación lipídica en el tejido cardiaco, renal y hepático, además de aumentar los niveles de GSH en dichos tejidos. Por consiguiente, también mostró reducir los niveles de colesterol, triglicéridos y c-LDL [86]. Mallick y Khan [87] mostraron que la administración del jugo de la misma especie a 8 ml/kg mostró los mismos efectos antihiperlipidémicos, además de un aumento de c-HDL a niveles comparables con fármaco estándar atorvastatina. En un estudio dirigido por Siti y colaboradores, el extracto derivado de las hojas de las especies de *Citrus,* ya patentado, redujo la actividad de la ECA, la hemo oxigenasa-1 (HO-1), el tromboxano (TXA2), la prostaciclina (PGI2), la peroxidación de lípidos y redujo el aumento del grosor de la íntima-media aórtica en ratas alimentadas con aceite calentado [85]. Yamada y colaboradores en un estudio, mostraron que, el consumo frecuente de frutas cítricas se asoció con una menor incidencia accidentes cerebrovasculares e infartos cerebrales [88]. Los informes coinciden en que estas especies logran regular la presión arterial además de reducir el daño vascular, posiblemente a través de los efectos de modulación de enzimas implicadas en el estrés oxidativo [85-88].

(*Continúa*)

Tabla 1. (*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
***Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) - Piña**	La fruta es usada para controlar los ataques epilépticos, bajar de peso colesterol, triglicéridos [16].	Compuestos fenólicos, flavonoides [89] tales como ácido gálico, catequina, epicatequina y ácido ferúlico, además del ácido ascórbico [90]. La piña es rica en bromelina, un grupo de enzimas proteolíticas que se asocian comúnmente con endopeptidasas que están presentes en toda la familia de plantas Bromeliaceae [85, 91, 92].	**Efecto cardioprotector e hipocolesterolemico:** Seenak y colaboradores, informaron que la alimentación con 200 mg/kg de piña durante 8 semanas en ratas hipercolesterolémicas, disminuyó los niveles de lípidos séricos, además de reducir el estrés oxidativo del tejido cardiaco debido a su buena capacidad antioxidante y reductora de la actividad del malondialdehído [90]. Mediante estos mecanismos, los autores han demostrado que el consumo de piña puede reducir el coeficiente aterogénico y la razón de riesgo cardíaco [90].
***Aloe vera* (L.) Burn. F. (Asphodelaceae) - Sábila**	La pulpa múltiples usos, siendo los más destacados para disminuir los niveles de colesterol, gastritis, caída del cabello, desinflamar golpes y tratar quemadura [16, 19].	Contiene vitaminas, enzimas, antraquinonas (aloína y emodina), ácidos grasos como el lupeol y campesterol; hormonas (auxinas y giberelinas), ácido salicílico y ligninas [93, 94]. El acemanano, una polimanosa soluble β-(1,4)-diacetilada es el principal polisacárido bioactivo que se extrae de la piel y el gel [95].	**Efecto cardioprotector:** Se informó que un polisacárido de selenio (Se-AVP) del *A. vera* a dosis de 400 mg/kg redujo el daño miocárdico al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GSH y CAT) y por lo tanto disminuyó la apoptosis celular [96]. Además, Sumi y colaboradores [97], demostraron que la suplementación con gel de *A. Vera* disminuyó el infarto del miocardio en ratas tratadas con isoprenalina. **Actividad antihipertensiva:** Se evidenció que la emodina suprimió la vasoconstricción inducida por fenilefrina, ET-1 y 5-HT, además de las vasoconstricciones mediadas por canales de calcio, logrando así un mecanismo antihipertensivo [98]. **Efecto sobre el nivel de lípidos:** Huseini y colaboradores, en un estudio, reportaron que en los pacientes diabéticos (DM2) con hipercolesterolemia que fueron tratados con una cápsula de gel de aloe vera (300 mg durante 2 meses), se redujo los niveles de glucosa en sangre en ayunas, HbA1c, colesterol total y c-LDL [99].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Melissa officinalis **(Lamiaceae) – Toronjil de menta**	Las hojas y ramas su usan para aliviar el dolor de estómago, tratar epilepsia, ataques cardiacos, asma, diarrea, ensalmos, tos y gripe [16, 19].	Presencia de compuestos bioactivos de la clase flavonoides (ramnocitrina, isoquercitrina) ácido rosmárico, ácido gálico, ácidos triterpénicos (ácido ursólico y oleanólico) [100, 101] Los componentes principales del aceite esencial son el citronelal, isogeraniol, acetato de geraniol, acetato de nerol, cariofileno y óxido de cariofileno [100, 102].	**Actividad antiarrítmica y cardioprotectora:** En un estudio *in vivo*, el extracto de etanol (200 mg/kg) de la planta redujo la aparición de latidos ventriculares prematuros (VPB), fibrilación ventricular (VF) y taquicardia ventricular (VT) tras arritmias inducidas por $CaCl_2$ en ratas [103]. En otro estudio el extracto etanólico a la misma dosis mejoró la función cardíaca y la arquitectura miocárdica, a través de la reducción del estrés oxidativo en ratas con miocarditis autoinmune inducida [104]. El extracto acuoso (50-400 mg/kg/día, vía intraperitoneal) también mostró protección contra las arritmias ventriculares inducidas por la isquemia/reperfusión en ratas [105]. En el estudio de Joukar y colaboradores, el extracto acuoso a dosis de 50 mg/kg disminuyó la frecuencia cardíaca y el equilibro del sistema redox en ratas con lesión miocárdica inducida por el isoproterenol [106]. Shekarriz y colaboradores, realizaron un ensayo clínico cruzado doble ciego [107]. Investigaron 49 pacientes que recibieron cápsulas de *M. officinalis* (400 mg/día) durante 4 semanas, se encontró que las presiones arteriales sistólica y diastólica disminuyeron sin presencia de efectos adversos durante el estudio [107]. **Efecto sobre el nivel de lípidos:** El extracto acuoso a dosis 2 g/kg cada día durante 28, redujo los lípidos totales del suero, el colesterol y los niveles de enzimas hepáticas, y los niveles de GSH en el tejido hepático, lo que indica las actividades hipolipidémicas y hepatoprotectora [101].

(*Continúa*)

Nombre científico (familia) -Nombre común	Formas de usos tradicionales	Fitoquímica	Evidencia farmacológica de los efectos terapéuticos
Cymbopogon citratus **(Poaceae) – Zacate limón**	Las hojas se usan para aliviar la tos, reducir la fiebre, controlar la presión arterial alta, nerviosismo, diarrea, dolor de estómago [16, 19]	El aceite esencial contiene principalmente β-citronelol, geraniol y linalol; de la planta también se identifican fenólicos y flavonoides [108, 109]	**Efecto cardioprotector:** En un estudio *in vivo*, el extracto a 200 mg/kg vía oral, disminuyó la peroxidación de lípidos y la disminución de la actividad de los marcadores cardíacos en el suero de ratas con cardiotoxicidad inducida por isoproterenol [110]. Además, el β-citronelol, (1-20 mg/kg, vía intravenosa) redujo la presión arterial, inhibió las contracciones inducidas por $CaCl_2$, sin embargo, estas respuestas fueron inferiores a las obtenidas con nifedipina, un fármaco de referencia [109]. Dzeufiet y colaboradores, informaron que la mezcla de los extractos acuosos (50-150 mg/kg) de *P. americana*, *C. citratus*, *C. medica* y miel disminuyó los niveles de los lípidos séricos, redujo la presión arterial y restauró las actividades de las enzimas oxidativas con hipertensión inducida por etanol y sacarosa [111].

Discusión

La familia de Commelinaceae, está representada por el género *Tradescantia*, de las cuales son las 2 especies más conocidas, *T. spathacea y T. zebrina*, A pesar de ello no se han realizado estudios que verifiquen sus usos tradicionales sobre las ECV, sin embargo, se conoce que los compuestos fenólicos y las antocianinas presentes en la planta exhiben actividad antioxidante, mismos que pueden modificar eventos moleculares hacia una mejora en la función endotelial y, por lo tanto, desempeñar un papel importante en la prevención de ECV [112].

Las especies representativas del género *Citrus* (*C. limon, C. sinensis, C. aurantium y C. grandis*) demuestran buena actividad antioxidante, gracias a su alto contenido en polifenoles, que protege el sistema cardiovascular, al disminuir el estrés oxidativo, reducir la presión arterial y la acción de disminución de la inflamación [112]. Además, se ha evidenciado en ensayos clínicos que la ingesta de los cítricos tiene una asociación inversa con el riesgo de enfermedad cardiovascular, debido a que sus componentes pueden actuar sinérgicamente para minimizar dicho riesgo [113].

Así mismo, para el resto de las especies evaluadas, presentan en su composición química principalmente flavonoides fenólicos y polifenólicos. La quercetina, unos de los principales flavonoles, cuando está presente en el torrente sanguíneo, mejora la salud vascular y reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular en su forma conjugada, además el potencial antioxidante de los flavonoides es más sólido que el de la vitamina C y la vitamina E [114].

Los mecanismos implicados en las acciones terapéuticas son similares en todos los extractos de plantas evaluados. En la mayoría de los estudios realizados, el efecto de control de la presión arterial se basa en la capacidad del extracto para inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina [ECA]. Esta enzima es el blanco terapéutico de los medicamentos estándar usados para tratar la hipertensión, precisamente de los inhibidores de la ECA [115-117].

Por otra parte, estas plantas mostraron una actividad muy marcada para detener los procesos de estrés oxidativos y peroxidación lipídica, al mejorar la actividad de las enzimas oxidativas y así reducir con la apoptosis celular manteniendo en equilibrio el estado hemodinámico de los vasos sanguíneos y el tejido cardiaco. Además, al mismo tiempo mostraron actividad significativa en la reducción del colesterol total y c-LDL, con la mejora del aumento del c-HDL, reduciendo así el índice aterosclerótico. Entonces dado sus efectos protectores notables en el corazón y los vasos sanguíneos podría esperarse que estas plantas sirvan de nuevas intervenciones farmacológicas y sean útiles en el tratamiento clínico de enfermedades cardiovasculares.

Conclusión

En el sureste de México hay especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional, que aún no cuentan con evidencia científica, lo cual deja un amplio campo de investigación fitoquímica y farmacológica. Este análisis transversal demuestra que todavía se necesita seguir investigando para determinar los principios activos presentes en especies vegetales y sus usos farmacológicos con mecanismos de acción identificados que representen en mediano plazo nuevas moléculas bioactivas.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. British Heart Foundation, *Cardiovascular Disease (CVD) - types, causes & symptoms*, URL: https://www.bhf.org.uk/informationsupport/conditions/cardiovascular-heart-disease, consultado en abril de 2022.

2. NHS, *Cardiovascular disease*, URL: https://www.nhs.uk/conditions/cardiovascular-disease/, consultado en abril de 2022.

3. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Enfermedades cardiovasculares*, URL: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds), consultado en abril de 2022.

4. Organización Panamericana de la Salud (OPS), *La carga de las enfermedades cardiovasculares en la Región de las Américas, 2000-2019*, URL: https://www.paho.org/es/enfermedades-no-transmisibles-salud-mental/portal-datos-enfermedades-no-transmisibles-salud-0, consultado en abril de 2022.

5. ADA, *Cardiovascular disease risk factors*, URL: https://ada.com/cardiovascular-disease-risk-factors/, consultado en abril de 2022.

6. Fundación Española del Corazón, *Factores de riesgo*, URL: https://fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular.html, consultado en abril de 2022.

7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Know your risk for heart disease*, URL: https://www.cdc.gov/heartdisease/risk_factors.htm, consultado en abril de 2022.

8. E. Olvera Lopez, B. Ballard, A. Jan, *Cardiovascular Disease*, StatPearls Publishing, URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/, consultado en abril de 2022.

9. R. Hajar, Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives, *Heart Views*, **18**(3), 109-114 (2017).

10. Texas Heart Institute, *Factores de riesgo cardiovascular*, URL: https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/factores-de-riesgo-cardiovascular/, consultado en abril de 2022.

11. J.M. Flack, B. Adekola, Blood pressure and the new ACC/AHA hypertension guidelines, *Trends in Cardiovascular Medicine*, **30**(3), 160-164 (2020).

12. F.D. Fuchs, P.K. Whelton, High Blood Pressure and Cardiovascular Disease, *Hypertension*, **75**(2), 285-292 (2020).

13. S.E. Kjeldsen, Hypertension and cardiovascular risk: General aspects, *Pharmacological Research*, **129,** 95-99 (2018).

14. E. Kandaswamy, L. Zuo, Recent advances in treatment of coronary artery disease: Role of science and technology, *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(2), 424 (2018).

15. A. Shaito, D.T.B. Thuan, H.T. Phu, T.H.D. Nguyen, H. Hasan, S. Halabi, *et al*., Herbal medicine for cardiovascular diseases: Efficacy, mechanisms, and safety, *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 422 (2020).

16. M.A. Magaña Alejandro, L.M. Gama Campillo, R. Mariaca Méndez, El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México, *Polibotánica*, **29**, 213-262 (2010).

17. R. Gómez-Álvarez, Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México, *Revista Fitotecnia Mexicana*, **35**(1), 43-49 (2012).

18. M.A. Magaña Alejandro, Etnobotánica de las plantas medicinales en los huertos familiares de Tabasco, en: R. Marica-Méndez (editor), *El huerto familiar del Sureste de México*, Secretaría de Recursos Naturales y Protección Ambiental del Estado de Tabasco, México, 2012, pp. 176-196.

19. V. Alvarez-Quiroz, L. Caso-Barrera, M. Aliphat-Fernández, A. Galmiche-Tejeda, Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque

de Ayapa, Tabasco, México, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **16**(04), 428-454 (2017).

20. G. Bautista García, A. Sol Sánchez, A. Velázquez Martínez, T. Llanderal Ocampo, *Diversidad de flora medicinal en los huertos familiares en el Ejido La Encrucijada, Cárdenas, Tabasco, México*, Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals.com Tabasco, 2014 Villahermosa AcademiaJournals.com, 2014.

21. D. Pinto, M.d.l.L. Cádiz-Gurrea, A.M. Silva, C. Delerue-Matos, F. Rodrigues, Chapter 25-Cosmetics, en: C.M. Galanakis (editor), *Food Waste Recovery*, Academic Press, San Diego, 2021, pp. 503-528.

22. D. Bursać Kovačević, D. Brdar, P. Fabečić, F.J. Barba, J.M. Lorenzo, P. Putnik, Chapter 2 - Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds, en: F.J. Barba, P. Putnik, D.B. Kovačević (editors), *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability*, Academic Press, 2020, pp. 51-88.

23. A. Jiménez-Arellanes, J. Luna-Herrera, R. Ruiz-Nicolás, J. Cornejo-Garrido, A. Tapia, L. Yépez-Mulia, Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**, 109 (2013).

24. A. Ochoa-Zarzosa, M. Báez-Magaña, J.J. Guzmán-Rodríguez, L.J. Flores-Alvarez, M. Lara-Márquez, B. Zavala-Guerrero, *et al*., Bioactive molecules from native Mexican avocado fruit (*Persea americana* var. drymifolia): A review, *Plant Foods for Human Nutrition*, **76**(2), 133-142 (2021).

25. P. Monika, A. Geetha, The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin -A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity, *Phytomedicine*, **22**(10), 939-945 (2015).

26. J. Tabeshpour, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh, Effects of avocado (*Persea americana*) on metabolic syndrome: A comprehensive systematic review, *Phytotherapy Research*, **31**(6), 819-837 (2017).

27. A.I. Olushola, K.O. Aderibigbe, S.O Stephen, O.S. Ayodeji, biochemical effects of aqueous extract of *Persea americana* (Mill) on the myocardium of left ventricle of high salt-fed adult Wistar rats, *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **22**(4), 765-769 (2017).

28. C.A. Márquez-Ramírez, J.L. Hernández de la Paz, O. Ortiz-Avila, A. Raya-Farias, J.C. González-Hernández, A.R. Rodríguez-Orozco, *et al*., Comparative effects of avocado oil and losartan on blood pressure, renal vascular function, and mitochondrial oxidative stress in hypertensive rats, *Nutrition*, **54**, 60-67 (2018).

29. C.T. Musabayane, K. Moodley, M.M. Gondwe, D.R. Kamadyaapa, J.A.O. Ojewole, Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) aqueous leaf extract in experimental animals: cardiovascular topic, *Cardiovascular Journal of South Africa*, **18**(2), 69-76 (2007).

30. A. Sokpe, M.L.K. Mensah, G.A. Koffuor, K.P. Thomford, R. Arthur, Y. Jibira, *et al*., Hypotensive and antihypertensive properties and safety for use of *Annona muricata* and *Persea americana* and their combination products, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, 8833828 (2020).

31. O. Kolawole, Methanol leaf extract of *Persea americana* protects rats against cholesterol-induced hyperlipidemia, *British Journal of Medicine and Medical Research*, **2**(2), 235-242 (2012).

32. E.M. Sánchez-Domínguez, S. Rojas-Pérez, N.N. Agüero-Batista, Investigaciones actuales del empleo de *Allium sativum* en medicina, *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, **41**(3), 1-9 (2016).

33. H. Amagase, Clarifying the real bioactive constituents of garlic, *The Journal of Nutrition*, **136**(3), 716-725 (2006).

34. L. Recinella, A. Chiavaroli, F. Masciulli, C. Fraschetti, A. Filippi, S. Cesa, *et al*., Protective effects induced by a hydroalcoholic *Allium sativum* extract in isolated mouse heart, *Nutrients*, **13**(7), 2332 (2021).

35. A. Hosseini, H. Hosseinzadeh, A review on the effects of *Allium sativum* (Garlic) in metabolic syndrome, *Journal of Endocrinological Investigation*, **38**(11), 1147-1157 (2015).

36. I.A. Sobenin, V.A. Myasoedova, M.I. Iltchuk, D.W. Zhang, A.N. Orekhov, Therapeutic effects of garlic in cardiovascular atherosclerotic disease, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **17**(10), 721-728 (2019).

37. A.K. Sharma, A. Munajjam, B. Vaishnav, R. Sharma, A. Sharma, K. Kishore, *et al*., Involvement of adenosine and standardization of aqueous extract of garlic (*Allium sativum* Linn.) on cardioprotective and cardiodepressant properties in

ischemic preconditioning and myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac injury, *Journal of Biomed Research*, **26**(1), 24-36 (2012).

38. X.J. Xiong, P.Q. Wang, S.J. Li, X.K. Li, Y.Q. Zhang, J. Wang, Garlic for hypertension: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Phytomedicine*, **22**(3), 352-361 (2015).

39. H. Sakkas, Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(3), 429-438 (2017).

40. A.I. Antonescu Mintas, F. Miere Groza, L. Fritea, M. Ganea, M. Zdrinca, L. Dobjanschi, *et al*., Perspectives on the combined effects of *Ocimum basilicum* and *Trifolium pratense* extracts in terms of phytochemical profile and pharmacological effects, *Plants* (*Basel*), **10**(7), 1390 (2021).

41. F. Fathiazad, A. Matlobi, A. Khorrami, S. Hamedeyazdan, H. Soraya, M. Hammami, *et al*., Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**(1), 87 (2012).

42. A. Kuerban, Y. Almulaiky, R. Sheikh, S. Alzahrani, H. Al-Talhi, M. Nasrullah, *et al*., *In vivo* antithrombotic activity of ethanolic extract from *Ocimum basilicum* L, *Annual Research & Review in Biology*, **20**(5), 1-6 (2017).

43. A. Umar, G. Imam, W. Yimin, P. Kerim, I. Tohti, B. Berké, *et al*., Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats, *Hypertension Research*, **33**(7), 727-730 (2010).

44. E.A. Irondi, S.O. Agboola, G. Oboh, A.A. Boligon, Inhibitory effect of leaves extracts of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* on two key enzymes involved in obesity and hypertension in vitro, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **5**(4), 396-402 (2016).

45. S. Amrani, H. Harnafi, N.E.H. Bouanani, M. Aziz, H.S. Caid, S. Manfredini, *et al*., Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property, *Phytotherapy Research*, **20**(12), 1040-1045 (2006).

46. F.A. Dada, S.I. Oyeleye, S.A Adefegha, G. Oboh, Extracts from Almond (*Terminalia catappa*) leaf and stem bark mitigate the activities of crucial enzymes

and oxidative stress associated with hypertension in cyclosporine A-stressed rats, *Journal of Food Biochemistry*, **45**(3), e13435 (2021).

47. A.G. Terças, A.d.S. Monteiro, E.B. Moffa, J.R.A. dos Santos, E.M. de Sousa, A.R.B. Pinto, *et al*., Phytochemical characterization of *Terminalia catappa* Linn, extracts and their antifungal activities against *Candida* spp, *Frontiers in Microbiology*, **8**, 595 (2017).

48. P.C. Chikezie, R.C. Ekeanyanwu, A.B. Chile-Agada, Phytocomponents from *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, and *Terminalia catappa* altered membrane osmotic stability of sickle erythrocytes, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **9**(1), 9 (2020).

49. L.F.W.G. Moura, J.X. da Silva Neto, T.D.P. Lopes, S.R. Benjamin, F.C.R. Brito, F.E.A. Magalhães, *et al*., Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidoscolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **109**, 1670-1679 (2019).

50. R.V. García-Rodríguez, G.A. Gutiérrez-Rebolledo, E. Méndez-Bolaina, A. Sánchez-Medina, O. Maldonado-Saavedra, M.Á. Domínguez-Ortiz, *et al*., *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico, *Journal of Ethnopharmacology*, **151**(2), 937-943 (2014).

51. M.Z. Pérez-González, G.A. Gutiérrez-Rebolledo, L. Yépez-Mulia, I.S. Rojas-Tomé, J. Luna-Herrera, M.A. Jiménez-Arellanes, Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidoscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **89**, 89-97 (2017).

52. L. Miranda-Velasquez, A. Oranday-Cardenas, H. Lozano-Garza, C. Rivas-Morales, G. Chamorro-Cevallos, D.E. Cruz-Vega, Hypocholesterolemic activity from the leaf extracts of *Cnidoscolus chayamansa*, *Plant Foods for Human Nutrition*, **65**(4), 392-395 (2010).

53. I. Aguiñiga-Sánchez, J. Cadena-Íñiguez, E. Santiago-Osorio, G. Gómez-García, V.M. Mendoza-Núñez, J. Rosado-Pérez, *et al*., Chemical analyses and *in vitro* and *in vivo* toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, *Pharmaceutical Biology*, **55**(1), 1638-1645 (2017).

54. T. Siciliano, N. de Tommasi, I. Morelli, A. Braca, Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chroma-

tography photodiode array mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(21), 6510-6515 (2004).

55. G. Lombardo-Earl, R. Roman-Ramos, A. Zamilpa, M. Herrera-Ruiz, G. Rosas-Salgado, J. Tortoriello, *et al*., Extracts and fractions from edible roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with antihypertensive activity, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, 594326 (2014).

56. C. Ibarra-Alvarado, A. Rojas, S. Mendoza, M. Bah, D.M. Gutiérrez, L. Hernández-Sandoval, *et al*., Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases, *Pharmaceutical Biology*, **48**(7), 732-739 (2010).

57. C. Trejo-Moreno, G. Castro-Martínez, M. Méndez-Martínez, J.E. Jiménez-Ferrer, J. Pedraza-Chaverri, G. Arrellín, *et al*., Acetone fraction from *Sechium edule* (Jacq.) S.w. edible roots exhibits anti-endothelial dysfunction activity, *Journal of Ethnopharmacology*, **220**, 75-86 (2018).

58. J. Ma, X.D. Luo, P. Protiva, H. Yang, C. Ma, M.J. Basile, *et al*., Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla), *Journal of Natural Products*, **66**(7), 983-986 (2003).

59. N.M. Fayek, A.R.A. Monem, M.Y. Mossa, M.R. Meselhy, A.H. Shazly, Chemical and biological study of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen leaves (Sapotaceae) cultivated in Egypt, *Pharmacognosy Research*, **4**(2), 85-91 (2012).

60. S. Chunhakant, C. Chaicharoenpong, Antityrosinase, Antioxidant, and cytotoxic activities of phytochemical constituents from *Manilkara zapota* L. Bark, *Molecules*, **24**(15), 2798 (2019).

61. S.M. Barbalho, P.C. dos Santos-Bueno, D.S. Delazari, E.L. Guiguer, D.P. Coqueiro, A.C. Araújo, *et al*., Antidiabetic and antilipidemic effects of *Manilkara zapota*, *Journal of Medicinal Food*, **18**(3), 385-391 (2014).

62. J. Gao, C. Liu, H. Zhang, Z. Sun, R. Wang, Myricitrin exhibits anti-atherosclerotic and anti-hyperlipidemic effects in diet-induced hypercholesterolemic rats, *AMB Express*, **9**(1), 204 (2019).

63. S. Jia, M. Shen, F. Zhang, J. Xie, Recent advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities, *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(12), 2555 (2017).

64. S.A. Shodehinde, S.A. Adefegha, G. Oboh, S.I. Oyeleye, T.A. Olasehinde, E.E. Nwanna, *et al*., Phenolic composition and evaluation of methanol and aqueous extracts of bitter gourd (*Momordica charantia* L) leaves on angiotensin-I-converting enzyme and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation *in vitro*, *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **21**(4), 67-76 (2016).

65. M. Fan, E.K. Kim, Y.J. Choi, Y. Tang, S.H. Moon, The role of *Momordica charantia* in resisting obesity, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**(18), 3251 (2019).

66. J.A. Saliu, S.I. Oyeleye, T.A. Olasehinde, G. Oboh, Modulatory effects of stonebreaker (*Phyllanthus amarus*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) on enzymes linked with cardiac function in heart tissue of doxorubicin-stressed rats, *Drug and Chemical Toxicology*, **45**(1), 331-339 (2022).

67. D.Y. Saad, M.M. Soliman, A.A. Baiomy, M.H. Yassin, H.B. El-Sawy, Effects of Karela (Bitter Melon; *Momordica charantia*) on genes of lipids and carbohydrates metabolism in experimental hypercholesterolemia: biochemical, molecular and histopathological study, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**(1), 319 (2017).

68. G.A. Pereira, N.M. Peixoto-Araujo, H.S. Arruda, D.d.P. Farias, G. Molina, G.M. Pastore, Phytochemicals and biological activities of mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.): A review, *Food Research International*, **126**, 108713 (2019).

69. J.M. dos Santos, T.M. Alfredo, K.Á. Antunes, J.d.S.M. da Cunha, E.M.A Costa, E.S. Lima, *et al*., *Guazuma ulmifolia* Lam. decreases oxidative stress in blood cells and prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**, 2935051 (2018).

70. C. Caballero-George, P.M. Vanderheyden, T. de Bruyne, A.A. Shahat, H. van den Heuvel, P.N. Solis, *et al*., *In vitro* inhibition of [^{3}H]-angiotensin II binding on the human AT 1 receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* Bark, *Planta Medica*, **68**(12), 1066-1071 (2002).

71. G.A. Magos, J.C. Mateos, E. Páez, G. Fernández, C. Lobato, C. Márquez, *et al*., Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **117**(1), 58-68 (2008).

72. N.S. Dosoky, W.N. Setzer, Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils, *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(7), 1966 (2018).

73. M. Makni, R. Jemai, W. Kriaa, Y. Chtourou, H. Fetoui, *Citrus limon* from Tunisia: Phytochemical and physicochemical properties and biological activities, *BioMed Research International*, **2018**, 6251546 (2018).

74. B.M. Razavi, E. Arasteh, M. Imenshahidi, M. Iranshahi, Antihypertensive effect of auraptene, a monoterpene coumarin from the genus *Citrus*, upon chronic administration, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **18**(2), 153-158 (2015).

75. A.O. Ademosun, A.A. Adebayo, G. Oboh, Modulatory effect of some citrus (*Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus maxima*) peels on monoamine oxidase, phosphodiesterase-5 and angiotensin-1 converting enzyme activities in rat heart homogenate, *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **16**(1), 20180067 (2019).

76. J.B.L. Tan, Y.Y. Lim, S.M. Lee, Antioxidant and antibacterial activity of *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves, *Journal of Food Science and Technology*, **52**(4), 2394-2400 (2015).

77. J.B.L. Tan, Y.M. Kwan, The biological activities of the spiderworts (Tradescantia), *Food Chemistry*, **317**, 126411 (2020).

78. A. Bąkowska-Barczak, Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants -A review, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **14**(2), 107-115 (2005).

79. M. González-Avila, M. Arriaga-Alba, M. de la Garza, M.d.C. Hernández-Pretelín, M.A. Domínguez-Ortíz, S. Fattel-Fazenda, *et al*., Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract, *Toxicology in Vitro*, **17**(1), 77-83 (2003).

80. A. Palumbo, L.M. Casanova, M.F.P. Corrêa, N.M. da Costa, L.E. Nasciutti, S.S. Costa, Potential therapeutic effects of underground parts of *Kalanchoe gastonis-bonnieri* on benign prostatic hyperplasia, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2019**, 6340757 (2019).

81. D. Xu, M.J. Hu, Y.Q. Wang, Y.L. Cui, Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application, *Molecules*, **24**(6), 1123 (2019).

82. M.K. Kinaci, N. Erkasap, A. Kucuk, T. Koken, M. Tosun, Effects of quercetin on apoptosis, NF-κB and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury, *Experimental and Therapeutic Medicine*, **3**(2), 249-254 (2012).

83. L.P. Patiño-Cano, *Plantas medicinales cultivadas en Chiriquí: composición química, usos y preparación*, Sistema integrado de divulgación científica UNACHI, Panamá, 2017, p. 48.

84. J.B.L. Tan, W.J. Yap, S.Y. Tan, Y.Y. Lim, S.M. Lee, Antioxidant content, antioxidant activity, and antibacterial activity of five plants from the Commelinaceae family, *Antioxidants* (*Basel*), **3**(4), 758-769 (2014).

85. H.N. Siti, Y. Kamisah, M.I. Nur Iliyani, S. Mohamed, K. Jaarin, Citrus leaf extract reduces blood pressure and vascular damage in repeatedly heated palm oil diet-Induced hypertensive rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **87**, 451-460 (2017).

86. H.S. Parmar, A. Kar, Antiperoxidative, antithyroidal, antihyperglycemic and cardioprotective role of *Citrus sinensis* peel extract in male mice, *Phytotherapy Research*, **22**(6), 791-795 (2008).

87. N. Mallick, R.A. Khan, Antihyperlipidemic effects of *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, and their combinations, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **8**(2), 112-118 (2016).

88. T. Yamada, S. Hayasaka, Y. Shibata, T. Ojima, T. Saegusa, T. Gotoh, *et al*., Frequency of citrus fruit intake is associated with the incidence of cardiovascular disease: The Jichi Medical School cohort study, *Journal of Epidemiology*, **21**(3), 169-175 (2011).

89. M. Mohd Ali, N. Hashim, S. Abd Aziz, O. Lasekan, Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products, *Food Research International*, **137**, 109675 (2020).

90. P. Seenak, S. Kumphune, W. Malakul, R. Chotima, N. Nernpermpisooth, Pineapple consumption reduced cardiac oxidative stress and inflammation in high cholesterol diet-fed rats, *Nutrition & Metabolism*, **18**(1), 36 (2021).

91. C. Varilla, M. Marcone, L. Paiva, J. Baptista, Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects: A summary, *Foods*, **10**(10), 2249 (2021).

92. J.H. Lee, J.T. Lee, H.R. Park, J.B. Kim, The potential use of bromelain as a natural oral medicine having anticarcinogenic activities, *Food Science & Nutrition*, **7**(5), 1656-1667 (2019).

93. M. Sánchez, E. González-Burgos, I. Iglesias, M.P. Gómez-Serranillos, Pharmacological update properties of *Aloe Vera* and its major active constituents, *Molecules*, **25**(6), 1324 (2020).

94. V.K. Gupta, S. Malhotra, Pharmacological attribute of *Aloe vera*: Revalidation through experimental and clinical studies, *Ayu*, **33**(2), 193-196 (2012).

95. C. Liu, Y. Cui, F. Pi, Y. Cheng, Y. Guo, H. Qian, Extraction, purification, structural characteristics, biological activities and pharmacological applications of Acemannan, a polysaccharide from *Aloe vera*: A review, *Molecules*, **24**(8), 1554 (2019).

96. Y. Yang, M. Yang, F. Ai, C. Huang, Cardioprotective effect of *Aloe vera* biomacromolecules conjugated with selenium trace element on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, *Biological Trace Element Research*, **177**(2), 345-352 (2017).

97. F.A. Sumi, B. Sikder, M.M. Rahman, S.R. Lubna, A. Ulla, M.H. Hossain, *et al*., Phenolic content analysis of *Aloe vera* gel and evaluation of the effect of Aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis in isoprenaline-administered cardiac damage in rats, *Preventive Nutrition and Food Science*, **24**(3), 254-264 (2019).

98. K.M. Lim, J.H. Kwon, K. Kim, J.Y. Noh, S. Kang, J.M. Park, *et al*., Emodin inhibits tonic tension through suppressing PKCδ-mediated inhibition of myosin phosphatase in rat isolated thoracic aorta, *British Journal of Pharmacology*, **171**(18), 4300-4310 (2014).

99. H. Huseini, S. Kianbakht, R. Hajiaghaee, F. Dabaghian, Anti-hyperglycemic and anti-hypercholesterolemic effects of *Aloe vera* leaf gel in hyperlipidemic Type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, *Planta Medica*, **78**(04), 311-316 (2012).

100. S. Miraj, Rafieian-Kopaei, S. Kiani, *Melissa officinalis* L: A review study with an antioxidant prospective, *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, **22**(3), 385-394 (2017).

101. S. Bolkent, R. Yanardag, O. Karabulut-Bulan, B. Yesilyaprak, Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study, *Journal of Ethnopharmacology*, **99**(3), 391-398 (2005).

102. A. Shakeri, A. Sahebkar, B. Javadi, *Melissa officinalis* L. -A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, **188**, 204-228 (2016).

103. Z. Akhondali, M. Dianat, M. Radan, Negative chronotropic and antidysrhythmic effects of hydroalcoholic extract of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) on $CaCl_2$-induced arrhythmias in rats, *Electron Physician*, **7**(1), 971-976 (2015).

104. N.D. Draginic, V.L. Jakovljevic, J.N. Jeremic, I.M. Srejovic, M.M. Andjic, M.R. Rankovic, *et al*., *Melissa officinalis* L. Supplementation provides cardioprotection in a rat model of experimental autoimmune myocarditis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**, 1344946 (2022).

105. S. Joukar, Z. Zarisfi, G. Sepehri, A. Bashiri, Efficacy of *Melissa officinalis* in suppressing ventricular arrhythmias following ischemia-reperfusion of the heart: a comparison with amiodarone, *Medical Principles and Practice*, **23**(4), 340-345 (2014).

106. S. Joukar, H. Asadipour, M. Sheibani, H. Najafipour, S. Dabiri, The effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) pretreatment on the resistance of the heart to myocardial injury, *Pharmaceutical Biology*, **54**(6), 1005-1013 (2016).

107. Z. Shekarriz, S.A. Shorofi, M. Nabati, B. Shabankhani, S.S. Yousefi, Effect of *Melissa officinalis* on systolic and diastolic blood pressures in essential hypertension: A double-blind crossover clinical trial, *Phytotherapy Research*, **35**(12), 6883-6892 (2021).

108. A.C. Mendes Hacke, E. Miyoshi, J.A. Marques, R.P. Pereira, Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*), *Journal of Ethnopharmacology*, **260**, 113036 (2020).

109. J.F.A. Bastos, Í.J.A. Moreira, T.P. Ribeiro, I.A. Medeiros, A.R. Antoniolli, D.P. de Sousa, *et al*., Hypotensive and vasorelaxant effects of Citronellol, a monoterpene alcohol, in rats, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **106**(4), 331-337 (2010).

110. K. Gayathri, K.S. Jayachandran, H.R. Vasanthi, G.V. Rajamanickam, Cardioprotective effect of lemon grass as evidenced by biochemical and histopathological changes in experimentally induced cardiotoxicity, *Human & Experimental Toxicology*, **30**(8), 1073-1082 (2010).

111. P.D.D. Dzeufiet, A. Mogueo, D.C. Bilanda, B.F.O. Aboubakar, L. Tédong, T. Dimo, *et al*., Antihypertensive potential of the aqueous extract which combine leaf of *Persea americana* Mill. (Lauraceae), stems and leaf of *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. (Poaceae), fruits of *Citrus medical* L. (Rutaceae) as well as honey in ethanol and sucrose experimental model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**, 507 (2014).

112. Y.J. Zhang, R.Y. Gan, S. Li, Y. Zhou, A.N. Li, D.P. Xu, *et al*., Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases, *Molecules*, **20**(12), 21138-21156 (2015).

113. D. Aune, Plant foods, antioxidant biomarkers, and the risk of cardiovascular disease, cancer, and mortality: A review of the evidence, *Advances in Nutrition*, **10**(4), 404-421 (2019).

114. A. Ullah, S. Munir, S.L. Badshah, N. Khan, L. Ghani, B.G. Poulson, *et al*., Important flavonoids and their role as a therapeutic agent, *Molecules*, **25**(22), 5243 (2020).

115. B.S. Heran, M.M.Y. Wong, I.K. Heran, J.M. Wright, Blood pressure lowering efficacy of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors for primary hypertension, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2008**(4), CD003823 (2008).

116. F.H. Messerli, S. Bangalore, C. Bavishi, S.F. Rimoldi, Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension: To use or not to use? *Journal of the American College of Cardiology*, **71**(13), 1474-1482 (2018).

117. R. Chen, M.A. Suchard, H.M. Krumholz, M.J. Schuemie, Shea S, Duke J, *et al*., Comparative first-line effectiveness and safety of ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: A multinational cohort study, *Hypertension*, **78**(3), 591-603 (2021).

Cómo citar este artículo

F.C. Narez-Mendoza, O. Hernández-Abreu, Análisis transversal de especies vegetales del sureste de México, en su uso para enfermedades cardiovasculares, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 155-187 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102840

Artículo de investigación / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101890*

Uso de medicamentos y estilo de vida de estudiantes universitarios colombianos durante el confinamiento en tiempos de pandemia por COVID-19

Jaime Andrés González-Vega[1,2], Linda Lucía Guardo-Martínez[1,3], Cristhian Ibañez-Bersinger[1], Nerlis Pájaro-Castro[1]*, Alfonso Palmieri-Luna[2]

[1] Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas. Universidad de Sucre, Sincelejo, Sucre, Colombia.

*Autor de correspondencia: nerlis.pajaro@unisucre.edu.co

[2] Clínica Santa María, Sincelejo, Colombia.

[3] Clínica FOSCAL Internacional, Floridablanca, Colombia

Recibido: 29 de marzo de 2022

Revisado: 30 de agosto de 2022

Aceptado: 7 de septiembre de 2022

Resumen

Introducción: la pandemia por COVID-19 y el aislamiento preventivo obligatorio trajo una ventana de cambios, repercusiones en estilo de vida y automedicación en la población general, uno de los afectados fue la población universitaria. **Objetivo:** evaluar el estilo de vida y el consumo de fármacos en los estudiantes universitarios de Colombia durante el confinamiento por pandemia de COVID-19. **Materiales y métodos:** estudio observacional, descriptivo y transversal, dirigido por medio de encuesta virtual hacia estudiantes universitarios de Colombia; donde se evaluó hábitos de vida, frecuencia de síntomas relacionados a COVID-19 y uso de medicamentos. La información fue concentrada en una base de datos y sometida a análisis estadísticos descriptivos para determinar la diferencia ($p < 0.5$). **Resultados:** se obtuvo muestra de 2049 estudiantes de 82 universidades, conformado por 1289 mujeres (62,9%) y 743 hombres (36,3%). El síntoma más frecuente fue cefalea (71,2%), de estos 64,5% se automedicó con acetaminofén. Para prevenir COVID-19 un 15,5% ingirió vitaminas y 3,3% antibióticos. Además, el 47,5% no realizó ejercicio físico, 52,3% comió 4-6 veces al día, 49,6% presentó insomnio intermedio, 78,8% presentó dificultades de concentración durante clases virtuales, 40,6% utilizaba 4-7 horas al día a esparcimiento en dispositivos móviles y 41,8% 4-7 horas adicionales a clases virtuales. **Conclusiones:** se determinó que durante la

cuarentena por COVID-19 casi la mitad de encuestados no realizó ejercicio físico, la mayoría dedicó más de 8 horas del día al uso de dispositivos móviles o computadoras. Adicionalmente, se demostró un alto porcentaje de automedicación para síntomas de COVID-19.

Palabras clave: Estilo de vida, automedicación, estudiantes, covid-19, pandemias, cuarentena, universidades.

SUMMARY

Medication use and lifestyle of Colombian university students during confinement in times of COVID-19 pandemic

Introduction: the COVID-19 pandemic and mandatory preventive isolation brought with it a window of changes and repercussions in lifestyle and self-medication in the general population, one of those affected was the university population. **Objective:** to evaluate the lifestyle and drug use in Colombian university students during the confinement due to the COVID-19 pandemic. **Materials and methods:** observational, descriptive and cross-sectional study, conducted by means of a virtual survey to university students in Colombia; where lifestyle habits, frequency of symptoms related to COVID-19 and use of medications were evaluated. The information was concentrated in a database and subjected to descriptive statistical analysis to determine the difference ($p < 0.5$). **Results:** a sample of 2049 students from 82 universities was obtained, comprising 1289 women (62.9%) and 743 men (36.3%). The most frequent symptom was headache (71.2%), of which 64.5% self-medicated with acetaminophen. To prevent COVID-19, 15.5% took vitamins and 3.3% antibiotics. In addition, 47.5% did not exercise, 52.3% ate 4-6 times a day, 49.6% had intermediate insomnia, 78.8% had difficulty concentrating during virtual classes, 40.6% spent 4-7 hours a day on mobile devices and 41.8% spent an additional 4-7 hours in virtual classes. **Conclusions:** it was determined that during the COVID-19 quarantine almost half of the participants did not engage in physical exercise, most of them dedicated more than 8 hours of the day to the use of mobile devices or computers. Additionally, a high percentage of self-medication for COVID-19 symptoms was demonstrated.

Keywords: Life style, self-medication, students, covid-19, pandemics, quarantine, universities.

RESUMO

Uso de medicamentos e estilo de vida de universitários colombianos durante o confinamento em tempos de pandemia de COVID-19

Introdução: a pandemia de COVID-19 e o isolamento preventivo obrigatório trouxeram uma janela de mudanças, repercussões no estilo de vida e automedicação na população em geral, uma das afetadas foi a população universitária. **Objetivo:** avaliar o estilo de vida e o consumo de drogas em universitários colombianos durante o confinamento devido à pandemia de COVID-19. **Materiais e métodos:** estudo observacional, descritivo e transversal, realizado por meio de uma enquete virtual a estudantes universitários colombianos; onde foram avaliados hábitos de vida, frequência de sintomas relacionados ao COVID-19 e uso de medicamentos. As informações foram concentradas em um banco de dados e submetidas à análise estatística descritiva para determinar a diferença ($p < 0,5$). **Resultados:** obteve-se uma amostra de 2.049 estudantes de 82 universidades, composta por 1.289 mulheres (62,9%) e 743 homens (36,3%). O sintoma mais frequente foi a cefaleia (71,2%), destes 64,5% automedicaram-se com paracetamol. Para prevenir a COVID-19, 15,5% ingeriram vitaminas e 3,3% antibióticos. Além disso, 47,5% não praticavam exercícios físicos, 52,3% comiam de 4 a 6 vezes ao dia, 49,6% apresentavam insônia intermediária, 78,8% apresentavam dificuldade de concentração durante as aulas virtuais, 40,6% utilizavam de 4 a 7 horas por dia para recreação em dispositivos móveis e 41,8% 4-7 horas adicionais às aulas virtuais. **Conclusões:** foi determinado que durante a quarentena do COVID-19 quase metade dos inquiridos não realizou exercício físico, a maioria dedicou mais de 8 horas por dia ao uso de dispositivos móveis ou computadores. Além disso, foi demonstrado um alto percentual de automedicação para sintomas de COVID-19.

Palavras-chave: Estilo de vida, automedicação, estudantes, covid-19, pandemias, quarentena, universidades.

INTRODUCCION

La enfermedad causada por el Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), designada como COVID-19, afectó a aproximadamente 600 millones de los más de 7000 millones de habitantes a nivel mundial [1]. En el territorio colombiano, las cifras superaron los 6,2 millones casos [2]. Todo esto sin contar la

existencia de portadores asintomáticos no diagnosticados y que los recuentos de casos confirmados y reportados fueron solo una fracción de la carga general de COVID-19 [3]. La pandemia por SARS-CoV2 además de representar una emergencia de salud pública, global declarada por la OMS en enero del 2020 [4], generó estragos en sectores como la educación, la cultura, el turismo, el transporte, los deportes, y por supuesto la economía [5].

Aparte de la economía de un país, existieron múltiples estresores durante la pandemia que pudieron influenciar en aspectos psicológicos de las personas; algunos de estos fueron la duración del aislamiento, el miedo a la infección, la frustración o aburrimiento, los suministros inadecuados, imposición de leyes no conocidas de salud pública que infringían la libertad personal, la falta de información y la información confrontada publicada por las autoridades [6, 7]. Desde el inicio de la cuarentena en Colombia el día 25 de marzo del 2020, hasta su finalización, un gran porcentaje de la población colombiana encabezada por los estudiantes tanto escolares como universitarios se encontraba bajo confinamiento, esto pudo desembocar en alteraciones del estilo de vida, como disminución de la actividad física, sedentarismo, ciclo de sueño, vigilia y alimentación de esta población [8]. Además de lo anterior, una emergencia de salud pública puede afectar la salud mental de los individuos involucrados en el aislamiento, causando inseguridad, confusión, retraimiento emocional, que puede llegar incluso a condiciones psiquiátricas o comportamiento no saludables de estilo de vida [7].

Las encuestas virtuales, por la inherente imposibilidad de contacto físico y reuniones físicas durante el aislamiento preventivo obligatorio, abarcaron mayor importancia técnica para la obtención de información de investigadores sobre fenómenos comportamentales; diversas encuestas en línea demostraron, por ejemplo, la transmisibilidad o influencia de padre a hijo de preocupaciones, ansiedad, y depresión debido al aislamiento preventivo y sus consecuencias anteriormente mencionadas [9]. La preocupación de los individuos se debía, en parte, a la exposición y bombardeo exagerado de información que se recibía originaría de los medios de comunicación, que, aunque cumplían con su deber de informar, afectaban indirectamente al usuario produciendo mayor ansiedad y respuesta al estrés [10].

Diversos términos fueron empleados durante la pandemia, uno de ellos que ayudó a entender nuestro contexto, fue la llamada "Cibercondría". Los cibercondríacos, termino relativamente nuevo, se caracterizaron por presentar ansiedad relacionada con la obtención de información acerca de su propia salud en internet, teniendo en cuenta que la información no validada o inexacta puede tener consecuencias como aparición de trastornos mentales [11]. La cibercondría podría tener relación con la "Infodemia", unión entre los términos "Información" y "epidemia", ocurre gracias al aumento de la

cantidad de información alusiva a un tema que origina un exceso de información y de versiones, verificada o no, que dificulta el acceso a la real o importante en momentos donde más se necesita [12].

Los dos anteriores fenómenos tuvieron implicación directa en la automedicación durante la pandemia, definida la automedicación como el consumo de medicamentos para trastornos o síntomas autodiagnósticados [13]. La OMS considera la automedicación un problema de salud pública debido a que ocasiona un porcentaje alto de hospitalización debido a reacciones adversas medicamentosas (RAM), aumento del costo de tratamiento y aumento de morbilidad [14]. Se cree que la automedicación se incrementó durante la pandemia, secundario a la gran cantidad de información no oficial disponible en la red, diferentes estudios reportan una alta incidencia de este consumo no regulado de medicamentos, tanto entre estudiantes universitarios como en la población en general, ya sea de antibióticos como la azitromicina y amoxicilina, o antiinflamatorios tipo AINE [15-19].

Los estudiantes universitarios del nuestro país generalmente han tenido alta prevalencia de automedicación en anteriores épocas [20], sin embargo, en tiempos de miedo y ansiedad generados por la pandemia de COVID-19 la intuición general de muchas personas conlleva a aumentar aún más los niveles de automedicación, consumos que van desde el dióxido de cloro, vitaminas, medicamentos homeopáticos hasta medicamentos de venta bajo fórmula como antibióticos de amplio y reducido espectro [16, 21].

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los estilos de vida saludable son comportamientos repetidos diariamente que asumen los individuos con sentido de preservar la salud y mejorar condiciones dadas por el desacondicionamiento, resulta importante preservar mediante la actividad física, alimentación, correcta horas de sueño, y auto prohibición de sustancias, que se hayan demostrado disminuyan la salud a corto y largo plazo, como medicamentos no recetados, tabaco, alcohol y drogas ilegales para conservar en óptimas condiciones la salud de la población universitaria y general [22]. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar el estilo de vida y el consumo de fármacos en los estudiantes universitarios de Colombia.

Metodología

Este estudio es de tipo observacional, descriptivo, transversal. Se llevó a cabo desde mayo de 2020 hasta junio de 2020, la población de estudio fueron estudiantes universitarios de Colombia, de más de 80 universidades, tanto públicas como privadas y matriculados en programas académicos diferentes. Para conocer la muestra poblacional del estudio inicialmente se buscó en el Sistema Nacional de Información de la

Educación Superior las estadísticas sobre el número de estudiantes universitarios en el país. Con esta información se calculó el tamaño de la población teniendo en cuenta la siguiente formula estadística:

$$n = \frac{N \times Z_a^{\,2} \times p \times q}{d^2 \times (N-1) + Z_a^{\,2} \times p \times q}$$

En donde, N = tamaño de la población, Z = nivel de confianza, P = probabilidad de éxito, o proporción esperada, Q = probabilidad de fracaso, D = precisión (Error máximo admisible en términos de proporción).

Criterios de inclusión y exclusión:

Inclusión

- Cualquier persona con autoreporte de estudiante universitario en Colombia.

Exclusión

- Personas que no aceptaron el consentimiento informado.
- Personas con discapacidad o enfermedades incapacitantes que no puedan diligenciar la información empleando tecnologías.

Instrumentos para la recolección de la información: mediante un formulario de la aplicación Google Drive se realizó una encuesta para recolectar la información directamente de los estudiantes, donde se anotaron sus datos personales, semestre en curso, edad, y las preguntas de interés para realizar una caracterización sociodemográfica, del estilo de vida, uso de medicamentos, patrones de sueño y de alimentación, entre otros (ver anexo sobre preguntas del cuestionario). Se realizó la difusión de la encuesta por medio de redes sociales de estudiantes y Universidad de Sucre, correos electrónicos de docentes de distintas universidades y estudiantes de Colombia. Para la recolección de la información se requirió previamente consentimiento informado de los estudiantes, quienes solo participaron de forma voluntaria. Se informó que los datos obtenidos serían utilizados para producir evidencia relevante y oportuna sobre las repercusiones que ha desencadenado la pandemia por COVID-19 en el estilo de vida y uso de fármacos en los estudiantes universitarios de nuestro país.

Consideraciones éticas: este proyecto de investigación se rige por la Resolución 008430 del 4 de octubre /1993, título II de la Investigación en seres Humanos, Capítulo 1- De los Aspectos Éticos de la Investigación en seres Humanos (Ministerio de Salud República de Colombia) y la Declaración de Helsinki, por lo cual se declara que

esta investigación se llevó a cabo con seres humanos, y que prevalecieron los criterios del respeto a su dignidad, integridad humana, protección de sus derechos y su bienestar. No se puso en riesgo la salud de los estudiantes que participaron en el estudio, contó con consentimiento informado, en el momento de la encuesta y en todo momento de la investigación se hizo prevalecer el criterio del respeto a su dignidad, la protección de sus derechos y su bienestar. Este estudio fue confidencial, las respuestas fueron anónimas y no se preguntó por su nombre, dirección o teléfono de contacto, la participación fue voluntaria y se podía terminar la encuesta en cualquier momento, la información fue almacenada de manera segura y se utilizó con fines de investigación durante la pandemia. Es una investigación sin riesgos. La aprobación del comité de ética para esta investigación se encuentra en el anexo 1.

Análisis estadístico: para el procesamiento de los datos se tuvo en cuenta todos los formularios diligenciados en su totalidad. La información capturada en las encuestas se concentró en una base de datos de Excel. Los datos recolectados fueron organizados y procesados para ser analizados en el programa SPSS, donde se realizaron los análisis estadísticos descriptivos y tablas cruzadas para determinar diferencias significativas ($p < 0.5$) entre grupos. Los resultados se expresaron en porcentajes de las variables en estudio. Posteriormente, se realizó un análisis multivariado de regresión logística, lo que nos permitió modelar la asociación entre variables sociodemográficas, estilo de vida, consumo de medicamentos en tiempos de cuarentena por COVID-19. El primer paso consistió en la elección de las posibles variables a incluir en el modelo utilizando la prueba de Chi-cuadrado ($p< 0,2$), posteriormente se analizó posibles variables de confusión o de interacción. Por último, empleando las variables seleccionadas se construye el modelo final y se calcularon las respectivas razones de momios (odds ratio, OR) y sus intervalos de confianza de 95 %.

Resultados

Según el Sistema Nacional de Información de la Educación Superior SNIES para el 2018 el número de matrícula en Instituciones de Educación Superior en Colombia ascendió a 2 440 367 estudiantes, por lo tanto, utilizando la formula descrita en la metodología, el tamaño muestral resultó de 2026 estudiantes. En total se realizó 2090 encuestas en todo el territorio nacional, de los cuales el 99,1% (2071) aceptó el consentimiento informado y veintidós (22) encuestados no completaron el formulario. Por consiguiente, los resultados presentados en el presente estudio representan las respuestas enviadas por los 2049 estudiantes de las diferentes universidades de Colombia que cumplieron con los requisitos de inclusión y exclusión. El 48,7% de los estudiantes encuestados estuvo en el rango de 20-24 años, y entre 15-19 años, el 35,9%. El 15,4 % restante estuvo comprendido

entre las edades de 25 a mayor de 35. El 62,9% fue de sexo femenino, 36,3% fue de sexo masculino y el resto prefirió no decir su sexo. Los encuestados principalmente residieron en el área urbana (85,8%) de las diferentes poblaciones y ciudades de Colombia (249 en total) (Figura 1), estudiantes pertenecientes a 82 universidades tanto públicas como privadas, y matriculados en 89 programas académicos diferentes.

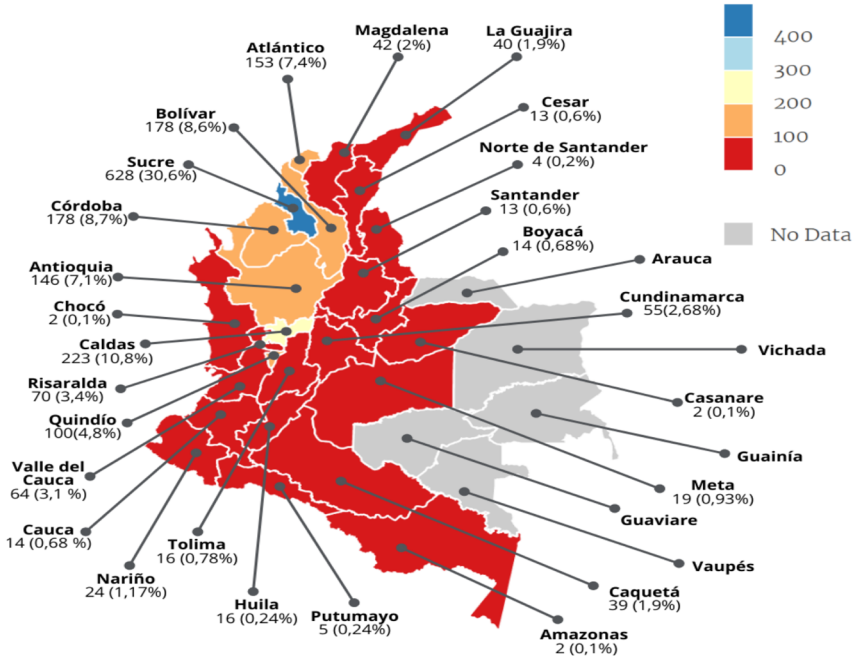


Figura 1. Distribución geográfica de las respuestas obtenidas de los estudiantes universitarios.

Las universidades donde se obtuvo mayor número de respuestas fueron Universidad de Sucre (29,6%), Universidad de Caldas (8,8%), Universidad de Córdoba (7,2%), Universidad del Atlántico (6,6%), Universidad de Antioquia (6,5%) y Universidad del Quindío (5%). Los estudiantes provenían principalmente de los siguientes programas académicos: Medicina (17,0%), Enfermería (7,8%), Ingeniería de alimentos (6,2%), Biología (5,6%), Psicología (4,6%), Fonoaudiología (4,3%), Tecnología en regencia de farmacia (4,3%) y Administración de empresas (4,1%). El semestre o el año en el que se encontraban los estudiantes al momento de la encuesta se muestra en la figura 2. Se evidenció que el mayor porcentaje de estudiantes estuvo en quinto-sexto semestre, tercer-cuarto semestre y primer-segundo semestre.

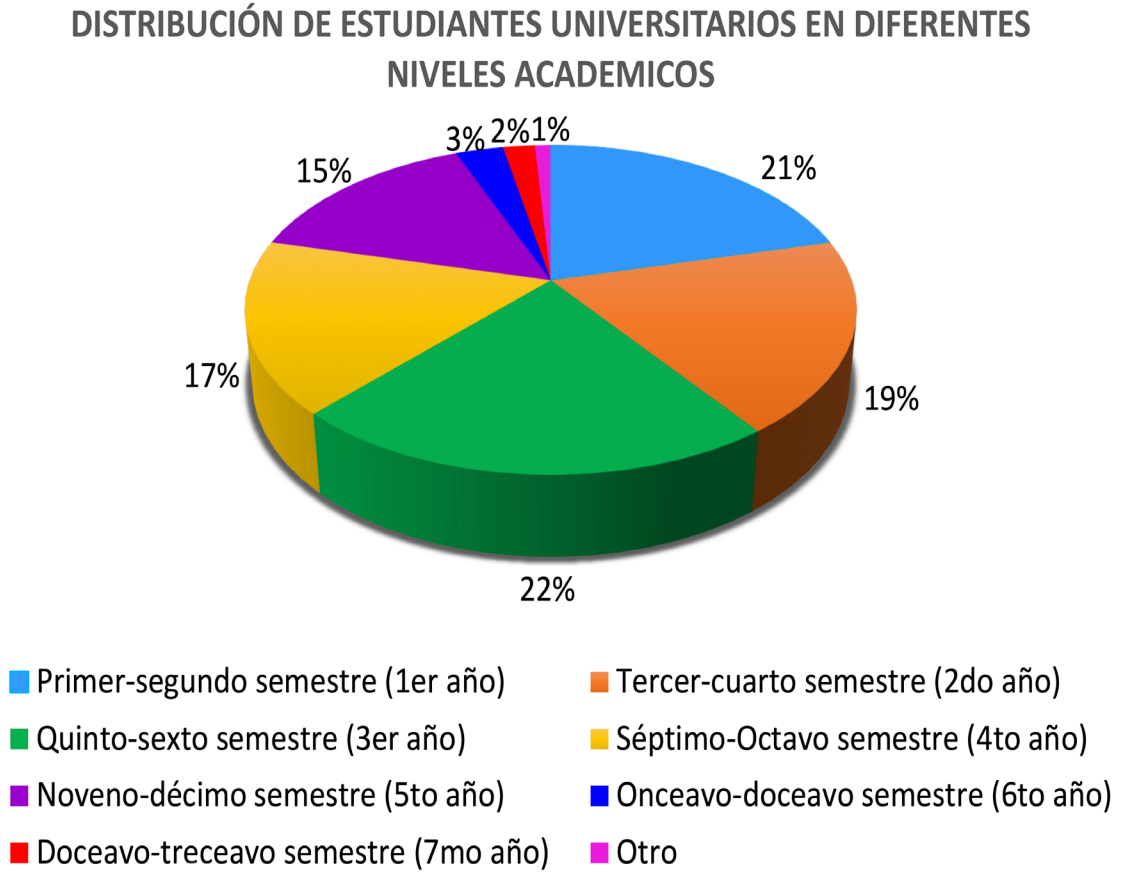


Figura 2. Distribución de los estudiantes universitarios colombianos en los diferentes niveles académicos

Los resultados obtenidos en cuanto a los síntomas percibidos por los estudiantes universitarios en el momento de la cuarentena en Colombia se muestran en la Figura 3.

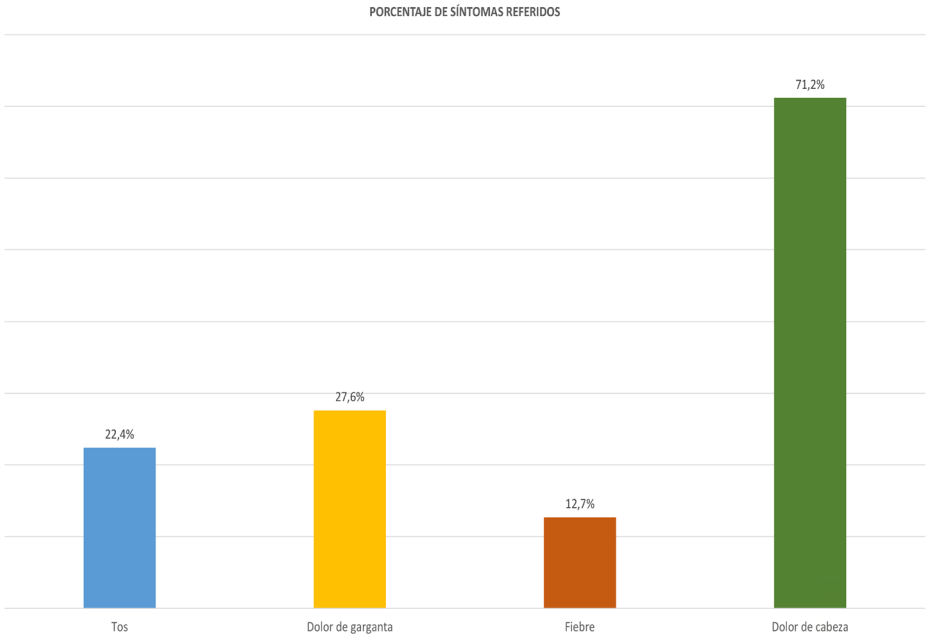


Figura 3. Porcentajes de síntomas presentes durante el confinamiento, referidos por los estudiantes universitarios.

Durante la pandemia es posible que la población haya incrementado el consumo de medicamentos con el fin de "prevenir" o contrarrestar los síntomas asociados al COVID-19, por tal razón en este estudio se evidenció que el 21,4% de estudiantes respondió que sí habían consumido algún medicamento, entre los más comunes, y no limitándose a, antibióticos, antivirales y/o suplementos vitamínicos, como se puede observar en la **tabla 1.**

Tabla 1. Porcentajes de medicamentos más utilizados por los estudiantes universitarios. n= 2049

Síntomas	Medicamento	Porcentaje (%) de consumo
Medicamentos para "prevenir" el COVID-19	Antibióticos	3,3
	Antivirales o antirretrovirale	0,9
	Suplementos o vitaminas	15,5

(*Continúa*)

Síntomas	Medicamento	Porcentaje (%) de consumo
Medicamentos para la Tos	Robitussin	0,5
	Bisolvon	0,3
	Mucosan	0,1
Medicamentos para el dolor de garganta	Antibióticos	3,7
	Advil	1,5
	Tylenol (paracetamol)	1,4
Medicamentos para tratar la fiebre	antibióticos	0,6
	Aspirina	0,5
	Acetaminofen/paracetamol	8,2
	Colecoxib	0,2
Medicamentos para el dolor de cabeza	Ibuprofeno	9,5
	Dolex	36,7
Medicamento o sustancia tranquilizante, ansiolítico, antidepresivo o relajante muscular	Marihuana	2,9
	Metocarbamol/carisoprodol	3,6
	busipirona/benzodiacepinas	0,4
Medicamentos nootrópicos	medicamentos estimulantes de memoria o atención)	4,3
Medicamento para conciliar el sueño	Metacarbamol	1,5
	Trazodona	1,6
	Otros	1,9

Teniendo en cuenta los principales síntomas asociados con el COVID-19: tos, dolor de garganta, fiebre, dolor de cabeza, entre otros; se pudo identificar que 71,2% de los encuestados padeció dolor de cabeza, siendo el síntoma frecuente, mientras que más de un 70% de los encuestados negó haber presentado tos, dolor de garganta ni fiebre (Figura 3). De los que presentaban tos, un 76,7% no consumió medicamentos, mientras que el 23,3% restante sí tomó medicamentos (tabla 1). Dentro del dolor de garganta, el 63% que lo padecía no tomó ningún medicamento, sin embargo, el 37% faltante sí consumió medicamentos para aliviarlo. Para los que sentían fiebre, el 20,47% no tomó ningún medicamento, mientras que, el 64,57% consumió acetaminofén y el 14,96% restante otros medicamentos para contrarrestar este síntoma. Por último, dentro de los que padecían dolor de cabeza, un 73,6% refirió sí haber consumido algún medicamento, mientras que el 26,4% no ingirió ningún medicamento para aliviar la cefalea.

Aunque se piensa que en tiempos de cuarentena los productos naturales juegan un papel muy importante y son constantemente usados, en este estudio se identificó que solo el 15,2% de los estudiantes consumió medicamentos de origen natural, entre los más consumidos, respondieron el jengibre con limón (2,8%), Limón con miel o agua caliente con limón (2,4%), Eucalipto (2,0%), manzanilla (1,6%), Limón, agua panela con canela o miel (1,5%), entre otros. Por otro lado, el 63,1% de los estudiantes recibió consejos sobre el uso de otro tipo de remedios caseros, por ejemplo, gárgaras con agua y bicarbonato de sodio, gárgaras con agua y sal, exponerse al frio o calor, entre otros para prevenir el COVID-19. Del mismo modo el 12,8% de los estudiantes aplicó este consejo y utilizó agua con bicarbonato de sodio y/o limón (2,5%), agua con sal caliente (2,8%), agua de limón caliente (1,5%) y otros (1,0%).

En este estudio se observó, respecto a consumo de sustancias tranquilizantes, que el 88,5% no consumió medicamentos o sustancias tranquilizantes, ansiolíticos, antidepresivos o relajantes musculares, mientras que el porcentaje restante sí consumió y entre las más comunes está metocarbamol/carisoprodol en un 3,7% y marihuana en el 2,9% de encuestados. Igualmente se investigó sobre el consumo de medicamentos nootrópicos, hallando que el 4,3% sí lo consumió, de los cuales el 29,4% lo consumía cada vez que estudiaba, el 27,1% una vez a la semana, el 11,5% de 2-5 veces a la semana, el 12,6% de 1-3 veces a la semana y el 19,4% de 4-7 veces a la semana. Curiosamente el 24,2% de los participantes que no han consumido nootrópicos pensó en hacerlo.

La incertidumbre generada por la pandemia y la cuarentena generó cambios en la alimentación de los estudiantes como también en la cantidad de comida consumida, la presente encuesta demostró que el 26% comía mucho, el 7,8% comía poco, el 4,2% comía en exceso, el 3,7% muy poco, mientras que el 58,3% restante piensa que comía lo suficiente. De forma similar, la encuesta reveló que 62,5% consideró que comía a velocidad normal, el 19,9% de forma rápida y el 17,6% de forma lenta, del mismo modo en este estudio se evidenció que casi la mitad (47,5%) de los estudiantes no realizó ningún ejercicio físico al día. Los resultados complementarios sobre el estilo de vida de los estudiantes universitarios se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados sobre el estilo de vida.

Pregunta	Respuesta (%)
Horas de sueño	entre 1-3 horas: 5,9
	entre 4-6 horas: 33,6
	entre 7-9 horas: 56,9
	más de 10 h: 3,6

(*Continúa*)

Pregunta	Respuesta (%)
Omisión de comidas	No: 65,4
	Sí, el desayuno: 22,5
	Sí, el almuerzo: 4,9
	Sí, la cena: 7,2
Frecuencia de consumo de alimentos	4-6 veces al día: 52,3
	1-3 veces al día: 44,8
	7-9 veces al día: 2,1
	más de 10 veces al día: 0,8
Dificultades de concentración en clases virtuales	Si: 78,8
	No: 21,2
Consumo de bebidas con cafeína	Sí, Gaseosas: 12,9
	Sí, energizantes: 4,0
	Sí, Café: 38,6
	Sí, Té: 4,4
	Sí he tomado, pero no se relaciona con la situación actual: 0,7
	Todas: 0,5
	Café, gaseosas y dulces: 0,6
	No, no he consumido estas bebidas: 38,3
Realización de ejercicios	Mas 2 horas/ día: 3,1
	1-2 hora/día: 16,0
	30-60 minutos/día: 20,8
	15 minutos/día: 12,5
	No realizo ejercicio físico: 47,5
Dificultad de conciliar el sueño	Fácil: 31,6
	Intermedia: 49,6
	Difícil: 18,7
Tiempo del día que está en la cama sin contar cuando duerme	0 horas: 18,8
	1-3 horas: 46,6
	4-7 horas: 21,5
	8-10 horas: 7,1
	Mas 10 horas: 5,9

(*Continúa*)

Pregunta	Respuesta (%)
Tiempo del día que gasta en el celular, en mensajería, noticias y/o redes sociales	1-3 horas: 28,1
	4-7 horas: 40,6
	8-10 horas: 17,8
	Mas 10 horas: 13,5
Tiempo que pasa frente a la pantalla del computador o celular en clases virtuales y desarrollando actividades académicas	1-3 horas: 19,4
	4-7 horas: 41,8
	8-10 horas: 23,3
	Mas 10 horas: 15,6

En relación con el consumo de cafeína, la frecuencia de su ingesta en estudiantes resultó de 1-3 veces/día en el 18,8% de los casos, de 1 a 2 veces a la semana en el 25,8%, 2 veces al mes en el 4,2%, una vez al mes en el 1,5% y todos los días de la semana en el 10,8%.

Durante la pandemia los estudiantes se enfrentaron a un cambio radical en su formato de educación, desde un tipo presencial a uno virtual que generó ansiedad y una necesidad de adaptación inminente, mientras a su vez intentaban aprender y generar buenos resultados académicos, esto se ve reflejado en que casi el 80% de los encuestados desarrolló dificultad para la concentración con el modelo de educación virtual durante el transcurso de la pandemia.

Con el propósito de medir la posible asociación entre el consumo de medicamentos, el estilo de vida y variables sociodemográficas en tiempos de cuarentena por COVID-19 se realizó una regresión logística. Utilizando las siguientes variables: Edad, sexo, área de residencia, universidad, programa, semestre, medicamentos para "prevenir" el COVID-19, medicamentos para la tos, medicamentos para el dolor de garganta, medicamentos para tratar la fiebre, medicamentos para el dolor de cabeza, medicamentos nootrópicos, medicamento o sustancia tranquilizante, ansiolítico, antidepresivo o relajante muscular, medicamento para conciliar el sueño, consumo de remedios naturales, omisión de comidas, frecuencia en el consumo de alimentos, dificultad de concentración, consumo de bebidas con cafeína, tiempo para hacer ejercicio, tiempo utilizado para dormir, forma de conciliar el sueño, tiempo empleado en el celular en mensajería, noticias, redes sociales y tiempo pasado frente a la pantalla del computador o celular en clases virtuales y desarrollando actividades académicas. De la asociación de variables sociodemográficas con consumo de medicamentos y estilo de vida de todas las variables analizadas, solo 11 ($p< 0,2$) mostró asociación (Sexo, medicamentos para el dolor de garganta, medicamentos para tratar la fiebre, medicamentos para el dolor de cabeza, consumo de remedios naturales, medicamento para conciliar el sueño, omisión de comidas, frecuencia en el consumo de alimentos, dificultad de concentración, con-

sumo de bebidas con cafeína y tiempo para hacer ejercicio) de las cuales solo 7 ingresó al modelo multivariado (Tabla 3).

Tabla 3. Asociación entre variables sociodemográficas, de estilo vida y de consumo de medicamentos en tiempos de cuarentena por COVID-19

Relación entre variable sexo con el consumo de medicamentos y el estilo de vida			
Variables	OR	P	IC95
Medicamentos para la tos	1,354	0,012	1,068-1,717
Medicamentos para el dolor de garganta	1,465	0,001	1,174 -1,827
Medicamentos para tratar la fiebre	1,436	0,017	1,067-1,932
Consumo de bebidas con cafeína	1,737	0,000	1,443-2,091
Tiempo para hacer ejercicio	0,867	0,000	0,806-0,933
Forma de conciliar el sueño	0,778	0,000	0,681- 0,889
Tiempo empleado en el celular en mensajería, noticias, redes sociales	0,808	0,000	0,736- 0,886
R cuadrado de Cox y Snell	0,069		
R cuadrado de Nagelkerke	0,094		
Relación entre variable consumo de medicamentos con el sexo y el estilo de vida			
Sexo	0,668	0,605	0,061-6,003
Consumo de bebidas con cafeína	1,653	0,000	1,368- 1,998
Tiempo para hacer ejercicio	0,926	0,041	0,861- 0,997
Forma de conciliar el sueño	0,796	0,001	0,696-0,911
Tiempo empleado en el celular en mensajería, noticias, redes sociales	0,838	0,000	0,763- 0,922
R cuadrado de Cox y Snell	0,104		
R cuadrado de Nagelkerke	0,139		
Relación entre variable estilo de vida con consumo de medicamentos y sociodemográficas			
Sexo	0,495	0,543	0,051-4,771
Edad	1,440	0,000	1,35-1,561
Medicamentos para la tos	1,571	0,004	1,291-1,782
Medicamentos para el dolor de cabeza	1,282	0,034	1,045-1,487
R cuadrado de Cox y Snell	0,086		
R cuadrado de Nagelkerke	0,134		

Con respecto al consumo de medicamentos, las variables (9) ($p< 0,2$) que mostraron asociación fueron: Sexo, omisión de comidas, dificultad de concentración, consumo de bebidas con cafeína, tiempo para hacer ejercicio, tiempo utilizado para dormir, forma de conciliar el sueño, tiempo empleado en el celular en mensajería, noticias, redes socia-

les y tiempo frente a la pantalla del computador o celular en clases virtuales y desarrollando actividades académicas, de las cuales solo 5 ingresaron al modelo multivariado.

Con respecto al estilo de vida las variables (11) ($p< 0,2$) que mostraron asociación fueron: Sexo, edad, medicamentos para "prevenir" el COVID-19, medicamentos para la tos, medicamentos para el dolor de garganta, medicamentos para tratar la fiebre, medicamentos para el dolor de cabeza, medicamentos nootrópicos, medicamento o sustancia tranquilizante, ansiolítico, antidepresivo o relajante muscular, medicamento para conciliar el sueño, consumo de remedios naturales, de las cuales solo 4 ingresaron al modelo multivariado.

Discusión

Este estudio observacional, descriptivo y transversal es de los primeros en Colombia en analizar en la población universitaria los factores del estilo de vida, incluidos el sueño, la salud mental, la actividad física, los hábitos alimentarios y el consumo de medicamentos a inicios de la pandemia por COVID-19. De acuerdo con los resultados obtenidos, las asociaciones entre las variables sociodemográficas con estilo de vida y consumo de medicamentos más altas fueron el consumo de medicamentos para la tos, el consumo de medicamentos para el dolor de garganta y para tratar la fiebre en tiempos de cuarentena por COVID-19, además del consumo de bebidas con cafeína. Con relación a la asociación del consumo de medicamentos con el sexo y el estilo de vida, las relaciones más altas fueron consumo de bebidas con cafeína y tiempo para hacer ejercicio. Finalmente, la relación entre variable estilo de vida con consumo de medicamentos y sociodemográficas de observó una mayor asociación entre edad y consumo de medicamentos para la tos.

En este estudio se determinó que casi la mitad de los estudiantes encuestados no realizó ejercicio físico, la mayoría dedicó más de 8 horas del día al uso de dispositivos móviles o computadoras, además que aproximadamente un cuarto de los encuestados estuvo en cama hasta 7 horas sin contar las horas de sueño; demostrando que el comportamiento sedentario es muy frecuente entre los estudiantes, todo esto debido a las medidas de aislamiento social creadas para evitar la diseminación del virus; el tiempo dedicado a la utilización de dispositivos móviles y uso de televisión, sea por actividades laborales, educativas o esparcimiento comúnmente se invierte estando sentado, reclinado o acostado [23], reduciendo así las actividades diarias al aire libre y representando un fuerte impacto que contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, enfermedad coronaria y accidentes cerebrovasculares, además de provocar efectos psicológicos no deseados como ansiedad, estrés, pensamientos sobre la muerte, entre otros [24].

Existe una relación entre el estado de ánimo, el ejercicio y la nutrición; en otros estudios se demostró que la realización de ejercicio físico de forma regular influye de manera positiva en el estado de ánimo y autorregulación, impactando de esta forma en un mayor control de la alimentación, se puede decir entonces que estos tres factores se encuentran relacionados entre sí; a esto se le conoce como "cambio de comportamiento de salud múltiple" evidenciando que cada uno de estos influye en el otro de manera simultánea [25].

En cuanto a los hábitos alimenticios, en los universitarios colombianos se evidenció que más de la mitad se alimentó de 4 a 6 veces al día incluyendo meriendas y este mismo porcentaje no omitió ningún alimento, es decir en cuanto a frecuencia de consumo de alimentos se encontraban en rangos adecuados, en este estudio no se evaluó la calidad de los alimentos ingeridos, sin embargo, otros estudios realizados durante la cuarentena en varios países, se ha encontrado un mayor consumo de dulces y snacks ricos en calorías [26, 27], además, se comprueba que la presencia de información excesiva sobre la pandemia puede causar estrés y esto generar cambios en las conductas alimentarias, dependiendo de la gravedad del factor estresante [28]. El estrés mencionado, aunado a desórdenes alimenticios como aumento del número de comidas y cantidad, incrementa el riesgo de ganancia de peso de los estudiantes, del mismo modo que la poca actividad física. Esto fue evidenciado en nuestro estudio en más de un cuarto de los encuestados; quienes consideraron que comían mucho, lo cual es motivo de preocupación porque provoca un abanico de consecuencias perjudiciales para la salud [23].

Profundizando en las medidas de salud pública y su efecto en los estudiantes, es muy probable que varios de los aspectos del estilo de vida de los universitarios hayan cambiado en la cuarentena por COVID-19, por ejemplo, el largo periodo de tiempo que transcurren delante de pantallas azules viendo noticias, clases y en mensajería pudo perjudicar las horas de sueño y estar relacionado con la dificultad de conciliar el sueño que poseían aproximadamente la mitad de los encuestados en el presente estudio [29].

De forma paralela, el encerramiento podrían exacerbar los problemas de salud mental de la población estudiantil, y es probable que los más afectados sean las personas sin patologías psiquiátricas de base [30] y los profesionales de la salud [31], sin embargo, los estudiantes también pudieron tener un aumento considerable de ansiedad, sensación de soledad, depresión, preocupación por la salud de familiares e incluso dificultad para terminar el semestre virtual [32, 33]. Estos problemas personales y familiares pueden retratar la dificultar para concentrarse en las clases virtuales que padecieron la mayoría de los encuestados y estar relacionado con la poca satisfacción de estos a la nueva modalidad virtual de la universidad, igualmente, diversas publicaciones han reportado la preferencia de los estudiantes por el modelo de presencialidad en contra

de virtualidad y la percepción de los estudiantes de haber aprendido más con el método tradicional [34-36].

Sin embargo, otros autores han observado un nivel superior de aceptación y adaptación al método virtual en los estudiantes más jóvenes en comparación con los mayores [37]. Esta resistencia y poco agrado por la metodología virtual observada en los estudiantes universitarios de Colombia podría explicarse por el intento de simulación o imitación del método tradicional extrapolado al formato virtual, por ejemplo, la implementación de métodos novedosos como "Flipped Classroom" o "Aula invertida", en la cual el profesor filma la clase por separado y los estudiantes la estudian de manera asincrónica para posteriormente reunirse a debatir, ha tenido buen impacto en diversos estudios con población universitaria o docente durante la pandemia [38, 39], e incluso las encuestas demostraban un porcentaje de aceptación mayor al 90% versus la metodología tradicional [40].

En relación al consumo de medicamentos, esta investigación permitió establecer que la automedicación fue una práctica prevalente dentro de los estudiantes universitarios del país cuando presentan síntomas alusivos a la enfermedad por coronavirus 19, resultado posiblemente, de la mezcla del escenario pandémico y la circulación masiva de información relacionada a fármacos, también llamado "Infodemia" [12], sin embargo, no se logró determinar verdaderamente si el consumo de este medicamento o cualquier otra sustancia aumentó en estudiantes por el encerramiento por Covid-19, de hecho, la limitación de este estudio la poseen otros autores [41, 42] debido a la metodología observacional transversal de los mismos, enfocándose solo en la prevalencia del consumo en estudiantes. Otros autores, por el contrario, pudieron establecer un cambio de frecuencia y tipo de fármaco, entre el que destaca el paso de un mayor consumo de analgésicos y antiinflamatorios (Precovid) a un mayor consumo de antibióticos/antiinflamatorios durante la pandemia, en población diferente a la universitaria [15], mientras que otros destacaron la alta prevalencia de la automedicación en jóvenes y adultos con porcentajes altos de utilización de antibióticos, ivermectina, antipiréticos y AINEs [43].

Estudios homólogos en Perú y ecuador, evidencian una coherencia o conexión en los resultados obtenidos con la presente investigación colombiana, por ejemplo, en el estudio peruano se estableció que el 51,3% de los estudiantes universitarios encuestados se automedicaba y que el medicamento más usado era el acetaminofén (Paracetamol) en el 41,4% del total [41], otras investigaciones con población más reducida, se observó la automedicación en el 85% de estudiantes universitarios [42] y dentro de las principales razones para automedicarse, los estudiantes mencionaban el poco tiempo que poseen para invertirlo en ir al médico, similitud con síntomas de enfermedades pasadas y aho-

rro de dinero [17, 42, 43]. En síntesis, varias investigaciones declararon que la cefalea era el síntoma más frecuente, que la automedicación es muy prevalente entre los estudiantes y el medicamento más usado fue el acetaminofén (paracetamol), concordando con los resultados obtenidos de esta investigación [19, 44, 45].

Aunque se esperaba que los estudiantes arrojarían resultados de alta prevalencia en consumo herbario o se dejarían llevar por noticias y consejos de conocidos para preparación de bebidas a base de hierba, no fue el caso, de hecho, poco más de 1/8 de los encuestados se automedicó con estas sustancias, esto puede estar relacionado con el área de residencia de los encuestados, en su mayoría área urbana (85%), en comparación con otros reportes que demuestran la alta tasa de la práctica [46].

Durante el análisis de artículos de consumo de medicamentos en el resto del mundo dirigidos a población general, uno de estos realizado en la localidad de Innsbruck, en Austria, por medio de análisis de aguas residuales, se logró demostrar que el uso de acetaminofén y codeína disminuyo durante el tiempo que la ciudad estuvo en cuarentena [47]. Por otro lado, en Brasil una investigación mencionó que las compras ambulatorias, es decir, automedicación, en 2020 de ivermectina e hidroxicloroquina en la población general aumentó 829% y 30,8% respectivamente, aumentando en ese mismo año los efectos adversos que pasaron de 18 casos desde 2009-2018 a más de 25 solo en 2020 [18]. Otros autores, notaron que en población hospitalizada no había asociación entre el conocimiento de la enfermedad y la previa automedicación (P=0.283), hallando que la ivermectina (66,7%) era el principal medicamento utilizado [48]. En esta investigación precisamos que la población universitaria colombiana no presentó abusos en el consumo de antibióticos populares de poca evidencia para prevención o tratamiento de la COVID-19.

Una de las inquietudes en la presente investigación iba dirigida a comprobar cuál fue el medicamento o sustancia tranquilizante, ansiolítico, antidepresivo o relajante muscular predominante entre los universitarios, y aunque el más usado resultó ser el metocarbamol, le seguía la marihuana en un 2,9% de los encuestados, ciertamente el consumo de antidepresivos y sustancias psicoactivas ha sido una situación de carácter crítico y en seguimiento en los últimos años entre los estudiantes universitarios de cualquier país [49, 50] y población general debido a las constantes actualizaciones legales del tema. Este nivel de consumo de marihuana fue parecido al de otros universitarios en Perú durante la pandemia y la relación de su consumo iba encaminada al sexo masculino, mayor año de estudios, cursos desaprobados y desempeño académico regular [51]. El entendimiento y seguimiento del consumo de sustancias psicoactivas puede ayudar a disminuir los efectos malignos como la violencia, fundados del escalonamiento de las sustancias psicoactivas o ilegales entre los jóvenes. [52, 53]

El también llamado "doping intelectual" [54] o uso de medicamentos nootrópicos, es decir, sustancia que aumenta capacidad cognitiva y de concentración, se ha extendido a lo largo del globo, sin embargo, no ha sido estudiado en población universitaria durante la pandemia, no obstante, anteriores revisiones [54, 55] han demostrado similitud de resultados obtenidos con la actual investigación colombiana, donde se demostró que los estudiantes ingerían escasamente esta sustancia (menos de un 5%), pero la frecuencia de uso en los consumidores era de forma exagerada (más de 2 veces por semana en el 60%) y cabe resaltar sobre los no consumidores que casi un 1/4 tiene interés latente en probarla, ya que posiblemente les parece aceptable. Teniendo en cuenta la naturaleza competitiva de la educación y espacios de trabajo se corre el riesgo de parecer aceptable o común para estudiantes o trabajadores su consumo, aumentando los efectos secundarios de esta droga, que resultan poco estudiadas para la farmacología, y en los que se encuentran: ansiedad, nerviosismo, pérdida del apetito, náuseas y hasta diarrea [56].

Cabe resaltar al respecto de la Vitamina C, que fue la segunda sustancia más consumida por los estudiantes universitarios de Colombia con la idea de prevenir el COVID-19, al mismo tiempo, que del otro lado del planeta una investigación de 460 participantes de Nigeria arrojó que la vitamina C fue el más utilizado por los universitarios con la misma intención preventiva. [19] La población diferente a la universitaria también hacia uso con intereses preventivos para COVID-19 de la vitamina C y medicina homeopática [57]. Las explicaciones de este uso desbordado de vitamina C durante la pandemia inician por la gran cantidad de información no confirmada (infodemia) que detallaban su efectividad en la prevención de infecciones del tracto respiratorio o afirmaciones de entidades, políticos y celebridades que apoyaban su uso y el de otras sustancias [58, 59].

La tormenta de factores múltiples que azotó a los estudiantes universitarios de Colombia durante la pandemia fue vista desde distintas perspectivas: médicas, políticas y económicas. Sin embargo, desde los ojos de un estudiante de universidad el panorama no fue nada agradable en cuanto a obtención de conocimiento y consecuencias de salud; los datos obtenidos y analizados en la presente encuesta resultan muy valiosos por ser la primera vez en la historia de la humanidad que se tiene la posibilidad de estudiar con lujo de detalles las alteraciones conductuales y anomalías psicológicas que provocan una pandemia en la educación universitaria, de este modo el comportamiento y fluctuación de estas variables o factores entre los estudiantes, debido a que ha sido una de los más involucradas en el proceso de confinamiento, permite generar un sondeo para el mejoramiento de conductas de estilo de vida saludable y reducción de automedicación en futuros eventos de salud pública similares, disminuyendo los riesgos de enfermedades psiquiátricas, metabólicas y cardiovasculares.

Agradecimientos

A todos los estudiantes participantes y los docentes de las diferentes universidades del país, en especial los profesores de la Universidad de Sucre, que con mucha voluntad aportaron en la replicación de la encuesta entre sus alumnos.

Declaración de conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Fuentes de financiación

Recursos propios de los autores.

Referencias

1. OMS, *WHO Coronavirus* (*COVID-19*) *Dashboard*, URL: https://covid19.who.int/, consultado en septiembre de 2022.

2. Ministerio de Salud de Colombia, Instituto Nacional de Salud, *COVID-19 en Colombia Corte 25-08-2022*, URL: https://www.ins.gov.co/Noticias/paginas/coronavirus.aspx, consultado en septiembre de 2022.

3. K. McIntosh, Enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): Epidemiología, virología y prevención, UpToDate, 2-16 (2023). URL: https://www.uptodate.com/contents/covid-19-epidemiology-virology-and-prevention

4. OPS, *Enfermedad por el Coronavirus* (*COVID-19*), URL: https://www.paho.org/es/enfermedad-por-coronavirus-covid-19, consultado en octubre de 2021.

5. Banco Mundial, *La COVID-19 (coronavirus) hunde a la economía mundial en la peor recesión desde la Segunda Guerra Mundial*, URL: https://www.bancomundial.org/es/news/press-release/2020/06/08/covid-19-to-plunge-global-economy-into-worst-recession-since-world-war-ii, consultado en julio de 2021.

6. S.K. Brooks, R.K. Webster, L.E. Smith, L. Woodland, S. Wessely, N. Greenberg, G.J. Rubin, The psychological impact of quarantine and how to reduce it: Rapid review of the evidence, *Lancet*, **395**(10227), 912-920 (2020).

7. B. Pfefferbaum, C.S. North, Mental health and the COVID-19 pandemic, *N. Engl. J. Med.*, **383**(6), 510-512 (2020).

8. M. Reyes-Ramos, M.d.L. Meza-Jiménez, Cambios en los estilos de vida durante el confinamiento por COVID-19, *Ciencia Ergo-Sum*, **28** (4), 10467403004 (2021).

9. Y. Zhang, N. Zhan, J. Zou, D. Xie, M. Liu, F. Geng, The transmission of psychological distress and lifestyles from parents to children during COVID-19, *J. Affect. Disord.*, **303,** 74-81 (2022).

10. D.R. Garfin, R.C. Silver, E.A. Holman, The novel coronavirus (COVID-2019) outbreak: Amplification of public health consequences by media exposure, *Health Psychol.*, **39**(5), 355-357 (2020).

11. S. Köse, M. Murat, Examination of the relationship between smartphone addiction and cyberchondria in adolescents, *Arch. Psychiatr. Nurs.*, **35**(6), 563-570 (2021).

12. S. García-Saisó, M. Marti, I. Brooks, W.H. Curioso, D. González, V. Malek, F.M. Medina, C. Radix, D. Otzoy, S. Zacarías, E.P. dos Santos, M. D'Agostino, Infodemia en tiempos de COVID-19, *Rev. Panam. Salud Pública*, **45**, e89 (2021).

13. R. Yakubu, A.M. Isa, I.J. Abubakar, I. Oreagba, A. Awaisu, Drug safety in Nigeria, en: Y. Al-Worafi (editor), *Drug Safety in Developing Countries: Achievements and Challenges*, Elsevier, 2020, pp. 525-556.

14. Y.M. Al-Worafi, Adverse drug reactions, en: Y. Al-Worafi (editor), *Drug Safety in Developing Countries: Achievements and Challenges*, Elsevier, 2020, pp. 39-57.

15. P.J. Navarrete-Mejía, J.C. Velasco-Guerrero, L. Loro-Chero, Automedicación en época de pandemia: COVID-19, *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, **13**(4), 350-355 (2020).

16. G. Kimathi, J. Kiarie, L. Njarambah, J. Onditi, D. Ojakaa, A cross-sectional study of antimicrobial use among self-medicating COVID-19 cases in Nyeri County, Kenya, *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, **11**(1), 111 (2022).

17. Z. Kifle, A. Mekuria, D. Anteneh, E. Enyew, Self-medication practice and associated factors among private health sciences students in Gondar Town, North West Ethiopia. A cross-sectional study, *Inquiry*, **58**, 469580211005188 (2021).

18. J.R. Rabelo-Melo, E.C. Duarte, M. Vogler de Moraes, K. Fleck, P.S. Dourado-Arrais, Automedicação e uso indiscriminado de medicamentos durante a pandemia da COVID-19, *Cad. Saude Publica*, **37**(4), e00053221 (2021).

19. A.I. Wegbom, C.K. Edet, O. Raimi, A.F. Fagbamigbe, V.A. Kiri, Self-medication practices and associated factors in the prevention and/or treatment of COVID-19 virus: A population-based survey in Nigeria, *Front. Public Health*, **9**, 606801 (2021).

20. C.A. López-Cabra, J.M. Gálvez-Bermúdez, C. Domínguez- Domínguez, A.D.P. Urbina-Bonilla, C.A. Calderón-Ospina, Á. Vallejos-Narváez, Automedicación en estudiantes de medicina de la Universidad del Rosario en Bogotá D. C., Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(3), 374-384 (2016).

21. C.A. Calderon-Ospina, F. Soler, A.M. Pérez-Acosta, El observatorio del comportamiento de automedicación de la Universidad del Rosario y su rol en la pandemia de Covid-19, *Revista Ciencias de la Salud*, **18**(2), 1-8 (2020).

22. A.R. Pelayo-Zavalza, L.F.J. Gómez-Chávez, Estilos de vida saludables en trabajadores: Análisis bibliométrico (2011-2020), *Dilemas Contemporáneos: Educación*, *Política y Valores*, **8**(spe5), 27 (2020).

23. O. Tokunbo, T. Abayomi, D. Adekomi, I. Oyeyipo, COVID-19: Sitting is the new smoking; the role of exercise in augmenting the immune system among the elderly, *Afr. Health Sci.*, **21**(1), 189-193 (2021).

24. A. Sonza, D. da C. de Sá-Caputo, A. Sartorio, S. Tamini, A. Seixas, B. Sanudo, J. Süßenbach, M.M. Provenza, V.L. Xavier, R. Taiar, M. Bernardo-Filho, COVID-19 lockdown and the behavior change on physical exercise, pain and psychological well-being: An international multicentric study, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**(7), 3810 (2021).

25. S. Amatori, S.D. Zeppa, A. Preti, M. Gervasi, E. Gobbi, F. Ferrini, M.B.L. Rocchi, C. Baldari, F. Perroni, G. Piccoli, V. Stocchi, P. Sestili, D. Sisti, Dietary habits and psychological states during COVID-19 home isolation in Italian college students: The role of physical exercise, *Nutrients*, **12**(12), 3660 (2020).

26. M. Pellegrini, V. Ponzo, R. Rosato, E. Scumaci, I. Goitre, A. Benso, S. Belcastro, C. Crespi, F. De Michieli, E. Ghigo, F. Broglio, S. Bo, Changes in weight and nutritional habits in adults with obesity during the "Lockdown" period caused by the COVID-19 virus emergency, *Nutrients*, **12**(7), 2016 (2020).

27. A. Sidor, P. Rzymski, Dietary choices and habits during COVID-19 lockdown: Experience from Poland, *Nutrients*, **12**(6), 1657 (2020).

28. J.C. Liboredo, L.R. Anastácio, L.G. Ferreira, L.A. Oliveira, C.M. Della-Lucia, Quarantine during COVID-19 outbreak: Eating behavior, perceived stress, and their independently associated factors in a Brazilian sample, *Front. Nutr.*, **8**, 704619 (2021).

29. K. Ranjbar, H. Hosseinpour, R. Shahriarirad, H. Ghaem, K. Jafari, T. Rahimi, A. Mirahmadizadeh, P. Hosseinpour, Students' attitude and sleep pattern during school closure following COVID-19 pandemic quarantine: a web-based survey in south of Iran, *Environ. Health Prev. Med.*, **26**(1), 33 (2021).

30. N. Meda, S. Pardini, I. Slongo, L. Bodini, M.A. Zordan, P. Rigobello, F. Visioli, C. Novara, Students' mental health problems before, during, and after COVID-19 lockdown in Italy, *J. Psychiatr. Res.*, **134**, 69-77 (2021).

31. I.A. Mota, G.D. de Oliveira, I.P.S. Morais, T.F. Dantas, Impact of COVID-19 on eating habits, physical activity and sleep in Brazilian healthcare professionals, *Arq. Neuropsiquiatr.*, **79**(5), 429-436 (2021).

32. J. Lee, M. Solomon, T. Stead, B. Kwon, L. Ganti, Impact of COVID-19 on the mental health of US college students, *BMC Psychol.*, **9**(1), 95 (2021).

33. O.N. Becerra-Tello, S.M. Rodríguez-Horna, *Uso de medicamentos y el afrontamiento para el manejo del estrés en estudiantes de la Carrera Técnica Profesional de Fisioterapia y Rehabilitación del Instituto de Educación Superior Tecnológico Privado "De Salud Alberto Barton Thompson" (ABAT) frente a la pandemia Covid-19, Cajamarca 2020*, Tesis de Grado, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Perú, 2021.

34. A.M. Bankole, Students' Perception of and attitude to online teaching during COVID-19 lockdown at Babcock University, *Euro Glob. Contemp. Stud. J.*, **1**(1), 47-57 (2021).

35. H. Hermanto, N.G.M. Rai, A. Fahmi, Students' opinions about studying from home during the COVID-19 pandemic in Indonesia, *Cypriot J. Educ. Sci.*, **16**(2), 499-510 (2021).

36. A. Alsoufi, A. Alsuyihili, A. Msherghi, A. Elhadi, H. Atiyah, A. Ashini, A. Ashwieb, M. Ghula, H. Ben Hasan, S. Abudabuos, H. Alameen, T. Abokhdhir, M. Anaiba, T. Nagib, A. Shuwayyah, R. Benothman, G. Arrefae, A. Alkhwayildi, A. Alhadi,

A. Zaid, M. Elhadi, Impact of the COVID-19 pandemic on medical education: Medical students' knowledge, attitudes, and practices regarding electronic learning, *PLoS One*, **15**(11), e0242905 (2020).

37. R.E. Romero-Alonso, C.A. Tejada-Navarro, O. Núñez, R.E. Romero-Alonso, C.A. Tejada-Navarro, O. Núñez, Actitudes hacia las TIC y adaptación al aprendizaje virtual en contexto COVID-19, alumnos en Chile que ingresan a la educación superior, *Perspect. Educ.*, **60**(2), 99-120 (2021).

38. Q. Qian, Y. Yan, F. Xue, J. Lin, F. Zhang, J. Zhao, Coronavirus disease 2019 (COVID-19) learning online: A flipped classroom based on micro-learning combined with case-based learning in undergraduate medical students, *Adv. Med. Educ. Pract.*, **12**, 835 (2021).

39. J. Collado-Valero, G. Rodríguez-Infante, M. Romero-González, S. Gamboa-Ternero, I. Navarro-Soria, R. Lavigne-Cerván, Flipped classroom: Active methodology for sustainable learning in higher education during social distancing due to COVID-19, *Sustainability*, **13**(10), 5336 (2021).

40. W.L. Polanco-Garay, D. Moré-Soto, Del aprendizaje tradicional al aprendizaje invertido como continuidad del proceso educativo en contexto de COVID-19, *Mendive, Revista de Educación*, **19**(1), 214-226 (2021).

41. A. Miñan-Tapia, A. Conde-Escobar, D. Calderon-Arce, D. Cáceres-Olazo, A.J. Peña-Rios, R.C. Donoso-Romero, Factores asociados a la automedicación con fármacos relacionados a COVID-19 en estudiantes de ciencias de la salud de una ciudad peruana [Preprint], (2020). DOI: 10.1590/SciELOPreprints.1225

42. K.A. Ramírez-Sarango, J.I. Torres-Siguenza, M.Z. Agurto-Unuzungo, F.I. Zhunio-Bermeo, Factores que influyen en la automedicación durante la pandemia en estudiantes universitarios, *Rev. Estud. CEUS* (*Ciencia Estud. Unidad Salud*), **2**(2), 11-16 (2020).

43. E.M. Julcarima-Rosales, N. Lima-Silvera, *Factores condicionantes de la automedicación en tiempos de pandemia en el Distrito en Santa Anita – Lima 2020*, Tesis de Grado, Universidad Privada de Huancayo "Franklin Roosevelt", 2020.

44. A.B. Mekuria, E.M. Birru, M.T. Tesfa, M. Geta, Z.D. Kifle, T. Amare, Prevalence and predictors of self-medication practice among teachers' education training college students in Amhara region, Ethiopia: A cross-sectional study, *Front. Pharmacol.*, **11**, 593764 (2021).

45. N. Jha, P. Shankar, S. Palaian, Knowledge and Practice on Ecopharmacovigilance and Medicine Storage Amongst Medical and Dental Students in Lalitpur, Nepal, *Risk Manag. Health Policy*, **14,** 793-802 (2021).

46. R. Zau-Mafra, D.J. Lasmar, A.A. Rivas, *O consumo de remédios caseiros durante a pandemia do covid19 e a evidência da bioeconomia*, Manaus, Brazil, URL: https://edoc.ufam.edu.br/bitstream/123456789/3324/1/NT%20-%20v1%20n7.pdf, consultado en agosto de 2021.

47. V. Reinstadler, V. Ausweger, A.-L. Grabher, M. Kreidl, S. Huber, J. Grander, S. Haslacher, K. Singer, M. Schlapp-Hackl, M. Sorg, H. Erber, H. Oberacher, Monitoring drug consumption in Innsbruck during coronavirus disease 2019 (COVID-19) lockdown by wastewater analysis, *Sci. Total Environ.*, **757,** 144006 (2021).

48. R.V. Hinojosa-Aviles, F.L. Palma-Melgar, *Automedicación y conocimiento de la enfermedad en familiares de pacientes hospitalizados por COVID-19 en el HNDAC en el año 2020*, Tesis de Grado, Universidad Ricardo Palma, 2021.

49. K.d.C.G. Lelis, R.V.N.E. Brito, S. de Pinho, L. de Pinho, Sintomas de depressão, ansiedade e uso de medicamentos em universitários, *Rev. Port. Enferm. Saúde Ment.*, **23**, 9-14 (2020).

50. B.d.O.P. Sousa, A.L.T. de Souza, J. de Souza, S.A. dos Santos, M.A. dos Santos, S.C. Pillon, Nursing students: medication use, psychoactive substances and health conditions, *Rev. Bras. Enferm.*, **73** (suppl 1), e20190003 (2020).

51. V.F. Taboada-Villarreyes, *Factores asociados al consumo de sustancias psicoactivas en estudiantes de medicina de la Universidad Nacional de Piura, en el contexto de la pandemia por COVID-19, durante el primer semestre del 2021*, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Piura, 2021.

52. P.O. Iglesias, R.A. Escalona, A.M. Escalona, A.B. Alvarez-Licea, Effect of the use of drugs and the dangers that their use implies young people and students, *Rev. Med. Multimed*, **22**(6), 1280-1298 (2018).

53. F. Ornell, S.C. Halpern, C. Dalbosco, A.O. Sordi, B.S. Stock, F. Kessler, L.B. Telles, Violência doméstica e consumo de drogas durante a pandemia da COVID-19, *Pensando Familias*, **24**, 3-11 (2020).

54. E.S. de O. Trigueiro, M.I.d.S. Leme, Estudantes e o doping intelectual: vale tudo na busca do sucesso no vestibular?, *Psicologia Escolar e Educacional*, **24**, e219948 (2020).

55. B.A. Aliaga-Sánchez, *Relación entre el consumo de nootrópicos y estrés académico en universitarios de Lima Metropolitana*, Tesis de Grado, Universidad Peruana Unión, 2019.

56. S. Zaami, R. Rinaldi, G. Bersani, A. del Rio, C. Ciallella, E. Marinelli, Nootropics use in the workplace: Psychiatric and ethical aftermath towards the new frontier of bioengineering, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **24**(4), 2129-2139 (2020).

57. A. Sadio, F. Gbeasor-Komlanvi, R. KONU, A. Bakoubayi, M. Tchankoni, A. Bitty-Anderson, I. Gomez, C. Denadou, J. Anani, H. Kouanfack, I. Kpeto, M. Salou, D. Ekouevi, Assessment of self-medication practices in the context of COVID-19 outbreak in Togo, *BMC Public Health*, **21**(1), 58 (2021).

58. A. Karni, K. Thomas, *Trump Says He's Taking Hydroxychloroquine, Prompting Warning From Health Experts*, New York Times, URL: https://www.nytimes.com/2020/05/18/us/politics/trump-hydroxychloroquine-covid-coronavirus.html, consultado en agosto de 2020.

59. A. Satariano, *YouTube pulls videos by Bolsonaro for spreading misinformation on the virus*, New York Times, URL: https://www.nytimes.com/2021/07/22/world/youtube-bolsonaro-covid.html?searchResultPosition=1, consultado en septiembre de 2021.

Cómo citar este artículo

J.A. González-Vega, L.L. Guardo-Martínez, C. Ibañez-Bersinger, N. Pájaro-Castro, A. Palmieri-Luna, Uso de medicamentos y estilo de vida de estudiantes universitarios colombianos durante el confinamiento en tiempos de pandemia por COVID-19, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 188-227 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101890

Anexo 1

Aprobación por parte del comité de ética e investigación Clínica Santa María S.A.S. Sincelejo, sucre:

Clínica Santa María S.A.S
¡Prestando Servicios de Salud con Calidez Humana!
NIT. 800.183.943-7

CLÍNICA SANTA MARIA S.A.S COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACION

ASPECTOS ÉTICOS A TENER EN CUENTA PARA LA EVALUACIÓN ÉTICA DE PROYECTOS DE INVESTIGACION

Ciudad: Sincelejo **Acta No:** 005 **Fecha:** 6 de octubre de 2021

1. **Nombre del investigador:** Jaime Andrés González Vega, Linda Lucía Guardo Martínez, Nerlis Pájaro Castro, Alfonso Palmieri Luna, Ibañez-Bersinger Cristian

Título de la investigación:

"***Uso de medicamentos y estilo de vida de estudiantes universitarios colombianos durante el confinamiento en tiempos de pandemia por COVID-19***"

Argumentesis

¿La investigación tiene valor, importancia social, científica o clínica, en los términos de Ezequiel Emanuel?
Si tiene valor

¿Por medio del protocolo de investigación, se evidencia la validez científica de la investigación?
Este proyecto de investigación, tal como está estructurado, si tiene validez científica

¿Es posible la realización de la investigación, en la forma en que está planteada?
Si es posible la investigación

Según lo consignado en el aparte del proyecto de investigación denominado según el título, y en sus consideraciones éticas Y a partir de la Resolución 8430 de 1993

Nombre del tipo de riesgo: Investigación sin riesgo

VIGILADO SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE SALUD
Supersalud

Carrera 22 No 16A - 47 Sincelejo - Sucre
Tel: 2812435-2815531-2826824
CLINICASANTAMARIA@CSM.NET.CO
WWW.CSM.COM.CO

Clínica Santa María S.A.S
¡Prestando Servicios de Salud con Calidez Humana!
NIT. 800.183.943-7

Sustente porque: Teniendo en cuenta la normatividad vigente.

¿Los siguientes principios bioéticos se tratan en el aparte de consideraciones éticas?

Principios	Si	No	Se menciona solamente	Relación de dicho principio con la investigación
Respeto a la autonomía	x			
Respeto a la privacidad y a la intimidad de los sujetos de investigación	x			
Beneficencia y/o No maleficencia	x			
Justicia, en los términos de igualdad y equidad	x			
Respeto a la Confidencialidad en la publicación delos resultados en relación con las instituciones, cuando la situación lo amerite	x			

¿Se debe solicitar consentimiento informado? SI ( ) NO (X)
¿Cuántos de ellos? ____¿A quiénes?

Decisión del comité de ética:

- ✓ Se da el aval ético para la realización de la investigación (X)
- ✓ Se niega el aval ético para el protocolo de investigación ( )
  ¿En qué términos?

Recomendaciones Generales: Se da aval ético para la publicación de los resultados de la investigación

Nombre y cargo del presidente del Comité de Ética e Investigación

Brillith Yolanda Pineda Ruiz
Comité de Ética e Investigación CSM

VIGILADO SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE SALUD
Supersalud

Carrera 22 No 16A - 47 Sincelejo - Sucre
Tel: 2812435-2815531-2826824
clinicasantamaria@csm.net.co
www.csm.com.co

Anexo 2

Estudio sobre el uso de medicamentos y estilo de vida de estudiantes universitarios en tiempo de pandemia por COVID-19

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Presentación del Estudio:

La COVID-19 es una nueva enfermedad respiratoria infecciosa causada por el virus SARS-COV-2. La pandemia de COVID-19 está teniendo efectos sobre la vida de todas las personas sin distinción alguna.

Esta investigación nace de la iniciativa del grupo de ciencias médicas y farmacéuticas de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad de Sucre y tiene como propósito producir evidencia relevante y oportuna sobre las repercusiones en el estilo de vida y uso de fármacos en los estudiantes universitarios de nuestro país.

Esta encuesta va dirigida a estudiantes universitarios de todas las universidades y carreras del territorio colombiano.

Generalidades de la investigación:

- Este estudio requiere contar con 15-20 minutos de su tiempo para completarla.
- La información que usted nos entregue será analizada por un equipo de investigadores del grupo de ciencias médicas y farmacéuticas de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad de Sucre
- Al hacer la encuesta usted está aceptando que ha leído y entendido la información sobre este estudio. Por favor asegúrese de leer bien la siguiente información antes de continuar.

Consideraciones éticas:

- Este estudio es confidencial, las respuestas son anónimas y no se preguntará por su nombre, dirección o teléfono de contacto.
- La participación es voluntaria y puede terminar la encuesta en cualquier momento.
- Esta información será almacenada de manera confidencial y se utilizará con fines de investigación durante la pandemia. Es una investigación sin riesgos.

Entiendo que:

- Mi participación es completamente voluntaria.

- La información que entregue es anónima y confidencial.

- La información será guardada de forma segura.

Al marcar la opción "Sí, acepto participar" estoy aceptando que he leído la información y que voluntariamente acepto participar en la investigación.

Sí, acepto participar / No acepto participar

ENCUESTA:

Información general:

1. ¿Cuál es su edad?

a. Entre 15 – 19 años

b. Entre 20 – 24 años

c. Entre 25- 29 años

d. Entre 30 – 34 años

e. Mayor de 35 años

2. ¿Cuál es su sexo?

a. Femenino

b. Masculino

c. Prefiero no decir

3. Área de residencia

a. Urbano

b. Rural

4. Lugar de residencia (nombre de pueblo o ciudad y departamento)

_____

5. Indicar el nombre completo de la universidad en la que estudia

_____

6. Indicar programa universitario

a. Medicina

b. Enfermería

c. Odontología

d. Biología

e. Derecho

f. Economía

g. Matemáticas

h. Física

i. Ing. Civil

j. Ing. Industrial

k. Química farmacéutica

l. Fonoaudiología

m. Administración

n. Periodismo

ñ. Psicología

o. Zootecnia

p. Ing. electrónica

q. Educación física

r. Otro ¿Cuál? ____

7. Indicar Semestre/ año que cursa

a. Primer-segundo semestre (1er año)

b. Tercer-cuarto semestre (2do año)

c. Quinto-sexto semestre (3er año)

d. Séptimo-Octavo semestre (4to año)

e. Noveno-décimo semestre (5to año)

f. Onceavo-doceavo semestre (6to año)

g. Doceavo-treceavo semestre (7mo año)

h. Posgrado

i. Otro ¿Cuál? ____

Uso de medicamentos:

8. ¿Ha consumido usted algún antimicrobiano (ejemplo: antibiótico, antiviral, antirretroviral), suplementos, vitaminas o sustancias para "prevenir" el covid-19, si es así, ¿indique el nombre del medicamento que ha consumido? Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Antibióticos

b. Sí, Antivirales o antirretrovirales.

c. Sí, Suplementos o vitaminas.

d. No, no he consumido ningún medicamento para "prevenir" Covid-19

e. Otro ¿cuál? _____

9. ¿Ha tenido TOS durante la cuarentena? Si es así, ¿Indique qué medicamento o REMEDIO ha utilizado para controlar la tos? Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Robitussin oral

b. Sí, Bisolvon

c. Sí, Mucosan

d. Sí, pero no he tomado medicamentos

e. No, no he tenido tos.

f. Otro ¿cuál? _____

10. ¿Durante la cuarentena ha sentido dolor de garganta, si es así, indique qué medicamento ha utilizado para controlar el dolor de garganta? Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Advil

b. Sí, Tylenol (paracetamol)

c. Sí, Antibióticos

d. Sí, pero no he consumido medicamentos

e. No, no he sentido dolor de garganta

f. Otro ¿cuál? _____

11. ¿Ha sentido fiebre durante la cuarentena? Si es así, indique el medicamento que ha consumido para la fiebre. Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Aspirina

b. Sí, Acetaminofen/paracetamol

c. Sí, Colecoxib

d. Sí, antibióticos

e. Sí, pero no he consumido medicamentos

f. No, no he sentido fiebre durante la cuarentena

g. Otro ¿cuál? _____

12. ¿Durante la cuarentena ha sentido dolores de cabeza? Si es así ¿Qué medicamentos o remedio ha usado para dolores de cabeza? Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Ibuprofeno

b. Sí, Dolex

c. Sí, pero no consumo medicamentos

e. No, no he sentido dolores de cabeza

f. Otro ¿cuál? _____

13. ¿Ha utilizado algún medicamento de origen natural (como hierbas), infusión o fitomedicamento para "prevenir" el COVID-19, si es así, ESCRIBA cuál?

_____

14. ¿Ha recibido consejos sobre el uso de otro tipo remedios caseros (ejemplo gárgaras con agua y bicarbonato de sodio, gárgaras con agua y sal, exponerse al frío o calor, etc) para prevenir el "COVID-19"?

a. Sí

b. No

15. ¿Ha aplicado estos consejos caseros para "prevenir" el COVID-19?

a. Si

b. No

16. Si la respuesta anterior es Sí, ESCRIBA cuál (si la respuesta anterior es no, indicar "no")

_____

17. ¿Desde que inició la cuarentena ha consumido algún medicamento o sustancia tranquilizante, ansiolítico, antidepresivo o relajante muscular? Si es así, mencione o ESCRIBA cuál. Si su respuesta no está en la lista, diligencie la casilla "Otro"

a. Sí, Marihuana

b. Sí, Metocarbamol/carisoprodol

c. Sí, busipirona/benzodiacepinas

d. No, no he consumido niguno de este tipo

e. Otro ¿cuál? _____

18. ¿Ha consumido medicamentos nootrópicos (medicamentos estimulantes de memoria o atención) o cualquier otra sustancia que aumente la concentración?

a. Sí

b. No, pero lo he pensado.

c. No, nunca lo he pensado.

19. ¿Si consumes nootrópicos o medicamentos para concentración, con qué frecuencia lo haces?

a. No, no consumo esto.

b. Cada vez que estudio

c. 1 vez a la semana

d. 2-5 veces a la semana

e. 1-3 veces a la semana

f. 4-7 veces a la semana

20. ¿Utiliza algún medicamento para conciliar el sueño? ¿Cuál?

a. No, no consumo estos medicamentos

b. ¿Cuál? _____

Estilo de vida:

21. ¿Cuántas horas duerme al día?

a. entre 1-3 horas

b. entre 4-6 horas

c. entre 7-9 horas

d. más de 10 horas

22. ¿Has omitido el desayuno, el almuerzo o la cena por falta de apetito debido a la situación actual por covid-19?

a. Sí, el desayuno

b. Sí, el almuerzo

c. Sí, la cena

e. No

23. ¿Con qué frecuencia omites esta comida?

a. No omito

b. 1-2 días/ semana

c. 3-4 días/semana

d. 5-7 días/semana

24. ¿Con qué frecuencia comes? eso incluye meriendas entre comidas

a. 1-3 veces al día

b. 4-6 veces al día

c. 7-9 veces al día

d. más de 10 veces al día

25. Consideras que en estos tiempos de cuarentena comes:

a. Muy poco

b. Poco

c. Lo suficiente

d. Mucho

e. En exceso

26. ¿Cómo comes?

a. Lento

b. Normal

c. Rápido

27. ¿Has tenido dificultades de concentración en clases virtuales o actividades que la requieran?

a. Sí

b. No

28. ¿Ante la situación actual te has sentido motivado a consumir bebidas con cafeína? si es así, ¿qué tipo de bebidas consumes?

a. Sí, Gaseosas

b. Sí, energizantes

c. Sí, Café

d. Sí, Té

e. No, no he consumido estas bebidas

f. Otra ¿cuál? _____

29. Si responde sí en la anterior ¿Con qué frecuencia la has consumido?

a. No

b. 1-3 veces/día

c. De 1 a 2 veces a la semana

d. Dos veces al mes

e. Todos los días de la semana

f. Una vez al mes

30. ¿Por cuánto tiempo realizas ejercicio físico al día, todos los días?

a. 2 horas/ día

b. 1 hora/día

c. 30-40 minutos/día

d. 15 minutos/día

e. No realizo ejercicio físico

31. ¿De qué forma concilia el sueño?

a. Fácil

b. Intermedia

c. Difícil

32. ¿Cuánto tiempo del día está en la cama sin contar cuando duerme?

a. 0 horas

b. entre 1-3 horas

c. entre 4-6 horas

d. entre 7-9 horas

e. más de 10 horas

33. ¿Cuánto tiempo del día gasta en el celular en mensajería, noticias, redes sociales, etc.?

a. entre 1-3 horas

b. entre 4-6 horas

c. entre 7-9 horas

d. más de 10 horas

34. ¿Cuánto tiempo pasa frente a la pantalla del computador o celular en clases virtuales y desarrollando actividades académicas?

a. entre 1-3 horas

b. entre 4-6 horas

c. entre 7-9 horas

d. más de 10 horas

Si tiene alguna duda o preocupación sobre este estudio puede contactar al Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas de la Facultad de ciencias de la salud de La Universidad de Sucre en el correo: cmf.unisucre@gmail.com

Scientific research article / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103333*

Mucuna pruriens (Velvet bean) seed extract ameliorates epilepsy and anxiety against in vivo experimental models: A histopathological analysis

Shanti Bhushan Mishra[1], Divya Rani Sharma[2]*, Shradhanjali Singh[3]

[1] United Institute of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Naini, Prayagraj, Uttar Pradesh, India

[2] United Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology, Naini, Prayagraj, Uttar Pradesh, India.

[3] United Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Naini, Prayagraj, Uttar Pradesh, India.

*Corresponding Author: tanudcs@gmail.com

Received: June 27, 2022

Corrected: September 17, 2022

Accepted: September 19, 2022

Summary

Introduction: the plant *Mucuna pruriens* is traditionally used in Indian system of medicine for the therapy of several neurological disorders. Chemical investigations on the plant have established the presence of levodopa and tryptamine which are responsible for treating the neurological disorders like Parkinsonism. **Objective:** the objective of this research was to scientifically explore and ascertain its antiepileptic and anxiolytic activity in preclinical studies on Swiss albino mice. **Material and Method:** the antiepileptic and anxiolytic effect of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* (EEMP) tested against maximal electroshock (MES) pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions, Elevated Plus Maze, and light and dark arena. Actophotometer test performed to evaluate its potential locomotor activity deficit inducing action. **Result:** treatment of mice with EEMP significantly upturned the MES-induced convulsions, which was reflected by diminution in the time interval (sec) of entire phases of MES-induced convulsions, with an improvement in GABA levels. In the PTZ model, pretreatment with EEMP delayed the latency and reduced the intensity to clonic convulsions ($p< 0.0001$), and also delayed the latency of tonic convulsions as well as decrease the mortality mice in the treated groups in

a dose-dependent manner. EEMP intervention dose dependently restored brain GABA levels. Assessment of GABA in mice's brain after administration of EEMP exhibits significant modulation of GABA levels. **Conclusion:** overall, the findings suggest that *Mucuna pruriens* has anticonvulsant and anxiolytic properties that are mediated by positive GABAergic neurotransmission hence could be used to treat epileptic seizures, petitmal and grandmal epilepsy.

Keywords: Anticonvulsant; anxiolytic; GABA estimation; maximal electroshock (MES); *Mucuna pruriens*; pentylenetetrazol (PTZ).

Resumen

extracto de semilla de *Mucuna pruriens* (frijol terciopelo) mejora la epilepsia y la ansiedad contra modelos experimentales in vivo: un análisis histopatológico

Introducción: la planta *Mucuna pruriens* se utiliza tradicionalmente en el sistema indio de medicina para la terapia de varios trastornos neurológicos. Las investigaciones químicas en la planta han establecido la presencia de levodopa y triptamina, que son responsables del tratamiento de trastornos neurológicos como el parkinsonismo. **Objetivo**: el objetivo de esta investigación fue explorar y determinar científicamente su actividad antiepiléptica y ansiolítica en estudios preclínicos en ratones albinos suizos. **Material y método**: el efecto antiepiléptico y ansiolítico del extracto etanólico de Mucuna pruriens (EMPE) se ensayó frente a convulsiones inducidas por electrochoque máximo (MES) pentilentetrazol (PTZ), Laberinto Elevado Plus y arena clara y oscura. Prueba de actofotómetro realizada para evaluar su potencial acción inductora de déficit de actividad locomotora. **Resultado**: el tratamiento de ratones con EEMP aumentó significativamente las convulsiones inducidas por MES, lo que se reflejó por la disminución en el intervalo de tiempo (s) de fases completas de convulsiones inducidas por MES, con una mejora en los niveles de GABA. En el modelo PTZ, el pretratamiento con EEMP retrasó la latencia y redujo la intensidad de las convulsiones clónicas ($p < 0{,}0001$), y también retrasó la latencia de las convulsiones tónicas, así como disminuyó la mortalidad de los ratones en los grupos tratados de una manera dependiente de la dosis. La intervención de EMPE restauró de forma dependiente de la dosis los niveles de GABA en el cerebro. La evaluación de GABA en el cerebro de ratones después de la administración de EEMP muestra una modulación significativa de los niveles de GABA. **Conclusión**: en general, los hallazgos sugieren que Mucuna pruriens tiene propiedades anticonvulsivas y ansio-

líticas que están mediadas por neurotransmisión GABAérgica positiva, por lo que podría usarse para tratar convulsiones epilépticas, epilepsia pequeña y granular.

Palabras clave: Anticonvulsivo; ansiolítico; estimador de GABA; electroshock máximo (MES); *Mucuna pruriens*; pentilentetrazol (PTZ).

Resumo

Extrato de semente de *Mucuna pruriens* (feijão aveludado) melhora a epilepsia e a ansiedade contra modelos experimentais in vivo: uma análise histopatológica

Introdução: a planta *Mucuna pruriens* é tradicionalmente utilizada na medicina indiana para o tratamento de diversas desordens neurológicas. Investigações químicas na planta estabeleceram a presença de levodopa e triptamina, responsáveis pelo tratamento de distúrbios neurológicos como o parkinsonismo. **Objetivo:** o objetivo desta pesquisa foi explorar cientificamente e verificar sua atividade antiepiléptica e ansiolítica em estudos pré-clínicos em camundongos albinos suíços. **Material e Método:** o efeito antiepiléptico e ansiolítico do extrato etanólico de Mucuna pruriens (EEMP) testado contra convulsões induzidas por eletrochoque máximo (MES), pentilenotetrazol (PTZ), labirinto em cruz elevado e arena clara e escura. Teste de actofotômetro realizado para avaliar sua potencial ação indutora de déficit de atividade locomotora. **Resultado:** o tratamento de camundongos com EEMP aumentou significativamente as convulsões induzidas por MES, o que se refletiu na diminuição do intervalo de tempo (seg) de fases inteiras das convulsões induzidas por MES, com uma melhora nos níveis de GABA. No modelo PTZ, o pré-tratamento com EEMP retardou a latência e reduziu a intensidade das convulsões clônicas ($p< 0,0001$), e também retardou a latência das convulsões tônicas, bem como diminuiu a mortalidade dos camundongos nos grupos tratados de maneira dose-dependente. A intervenção do EEMP restaurou os níveis cerebrais de GABA dependentes da dose. A avaliação de GABA no cérebro de camundongos após a administração de EEMP exibe modulação significativa dos níveis de GABA. **Conclusão:** no geral, os achados sugerem que Mucuna pruriens tem propriedades anticonvulsivantes e ansiolíticas que são mediadas por neurotransmissão GABAérgica positiva, portanto, pode ser usado para tratar crises epilépticas, epilepsia petitmal e grandmal.

Palavras-chave: Anticonvulsivante; ansiolítico; estimativa de GABA; eletrochoque máximo (MES); *Mucuna pruriens*; pentilenotetrazol (PTZ).

Introduction

Anxiety and depression are dynamic and catastrophic complicated disorders, and it is now clear that providing suitable treatment options for patients without knowledge of both the clinical and molecular aspects of anxiety and depression is challenging. In recent decades, impressive research has been done on a wide range of neurological features of depression and anxiety [1]. Benzodiazepines are now the most often given drugs for anxiety disorders, but their therapeutic applicability as anxiolytics are limited by their undesirable side effects. As a result, research into novel pharmacological drugs derived from plants is highly encouraged [2]. Herbal treatments are increasingly being used by physicians in Asia and Europe, and researchers are looking into ancient therapies to discover a viable solution for these mind-affecting ailments.

The plant realm is an undeniably rich source of bioactive compounds [3]. The current emphasis of scientific study is on extracting, identifying, and characterizing the bioactive components of medicinal plants that might be employed as "lead" molecules in therapeutic drug discovery and development [4]. *Mucuna pruriens* var. utilis, an undervalued tropical legume, offers nutritional quality comparable to soya beans and other traditional legumes due to comparable protein, lipids, mineral, and other nutrient proportions. It traditionally has been consumed as a meal in a variety of nations, including India, Philippines, Nigeria, Ghana, Brazil, and Malawi [5]. In Ayurvedic medicine *Mucuna pruriens* Linn is a well-known medicinal plant used to cure diabetes, impotence, cancer, snake bite, and Parkinsonism. *Mucuna pruriens* endocarp is non-toxic and is 2 to 3 times more potent than levodopa in managing hyperprolactinemia [6] and motor symptoms of Parkinson's disease in animal models [7]. *Mucuna pruriens* has also been demonstrated to have neuroprotective effects in Parkinsonism animal models by increasing brain mitochondrial complex-I activity and considerably restoring dopamine and norepinephrine levels [8]. The presence of 5-indolic chemicals, particularly tryptamine and 5-hydroxytryptamine, were reported in phytochemical analysis of the seeds [9]. Alkaloids like Mucunadine, Mucunine, Prurienine and Prurine have been reported in seeds of M. pruriens which are used as drug component in Psychiatry [10]. Therefore, the present research was designed to assess the anxiolytic and anti-convulsant activity of an ethanolic seed extract of *Mucuna pruriens*.

Materials and methods

Drugs and reagents

Diazepam was procured from Ranbaxy Laboratories, New Delhi, India and Phenytoin, Pentylenetetrazol and GABA were purchased from Sigma Aldrich, Bangalore. All the other reagents and chemicals used in this study were of standard analytical grade.

Collection, authentication and extraction of plant material

The study was conducted using ethanolic extract of *M. pruriens* (EEMP) seeds, for which the seeds were purchased from local market of Prayagraj Uttar Pradesh, India in the month of November 2021 and authenticated by taxonomist Dr. Arti Garg at the Botanical Survey of India in Prayagraj. The voucher specimen has been deposited with accession number BSI/CRC/2021-22/405. The collected seeds (500 g) were cleaned, crushed, grind, and extracted with 99% ethanol using a Soxhlet apparatus for 72 h at 50°C. A rotary evaporator (Buchi, USA) was used to evaporate the solvent followed by lyophilization thus 50g of solid residue (10%w/w) was obtained.

Preliminary phytochemical screening of extract

The EEMP was examined qualitatively for the presence of various secondary metabolites as per standard procedures [11]. The presence of flavonoids, phenolics, glycosides, tannins, polysaccharides, saponins, and steroids were confirmed in the ethanol extract of *Mucuna pruriens*.

High Performance Liquid Chromatography

For qualitative estimation of Dopamine HPLC was performed as per earlier reported method by Rathod and Patel (2014) [12]. Chromatographic separation was performed with AGILENT HPLC (Model no. 1220 Infinity) equipped with binary pump and auto injector (20 µl). Kromasil100–5–C18 (250mm× 4.6mm × 5µ) column was used for analysis. Mobile phase used was Water: Methanol: Acetonitrile (100:60:40) (v/v) containing 0.2% Triethylamine, pH 3.3 filtered through 0.45 µ membrane filter (Millipore) and degassed by sonication**.** Flow rate 1 ml / min maintained throughout the run. OpenLabCDS Version A.04.06 chromatographic software was used for data acquisition. Column effluent was monitored at 280 nm with variable wavelength UV detector.

In vivo pharmacological assessment

Experimental Animals

Swiss Albino mice of either sex (25–35 g, 4–5 months aged) were procured from IIT-BHU Varanasi and kept in propylene cages under 12-hour cycle of light and darkness. All animals were accessed to chow and clean water *ad libitum.* This research approved by Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) of United institute of Pharmacy with approval no. UIP/IAEC/Nov.-2021/14. The experiments were performed as per regulatory guidelines of Committee for the Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animals (CPCSEA) Government of India.

Selection of Dose of EEMP

Earlier studies [13, 14] show that seed extract administration had no animal mortality at the dose of 2000 mg/kg. Whereas, Golbabapour *et al.* (2013) [15] confirms that at 5000 mg/kg b.w dose didn't show any histological sign of hepatic toxicity and renal toxicity including normal blood biochemistry analysis in animal models. On the basis of above cited literature two doses viz. 250 mg/kg and its double strength 500 mg/kg has been selected for pharmacological activity.

Assessment of anticonvulsant activity

Pentylenetetrazol induced convulsion

Animals were divided into five groups of six animals each (n = 6). For three days, the animals were treated as follows: Group 1: water, Group 2: diazepam (5 mg/kg), Group 3: EEMP (250 mg/kg) and Group 4: EEMP (500 mg/kg) orally. On the third day, 1 hour after the given treatment, convulsions have been induced chemically by administering PTZ (80 mg/kg) as per previous reported method of Showraki *et al.* (2016) [16] with slight modification. The animals were individually monitored in a plastic cage for 30 minutes, with the animals that survived being followed for up to 24 hours. Individual data such as Latency (onset of clonus), Onset of tonic convulsions, and Percentage protection were recorded and reported as percentage protection during the individual observation.

$$\%\ \boldsymbol{Protection} = \mathbf{100} - \frac{\boldsymbol{Number\ of\ animal\ showed\ seizures}}{\boldsymbol{Total\ number\ of\ animals\ used}} \times \mathbf{100}$$

Maximal Electroshock Shock Induced Convulsion

Animals were divided into five groups of six animals each (n = 6). For three days, the animals were treated as follows: Group 1: water, Group 2: phenytoin (25 mg/kg), Group 3: EEMP (250 mg/kg) and Group 4: EEMP (500 mg/kg) orally. On the third day, exactly one hour after the given treatment, convulsions were induced through 60A current given trans-auricularly for 0.2 seconds through tiny alligator clips affixed to each pinna using electro-convulsiometer as per previous reported method by Vogel and Vogel (2000) [17] with slight modification. The animals were monitored individually in a plastic cage for 30 min. During the observation, characteristics such as hind limb flexion, hind limb extensor, stupor, and death/survival were recorded, and the % protection was determined.

Assessment of anxiolytic activity

Elevated plus maze model

Two open arms (35 × 5 cm) and two closed arms (30 × 5 × 15 cm) extend from a shared center platform (5 × 5 cm) of the apparatus. The closed arms' floor and walls are black-painted wood. The entire maze is raised to a height of 50 cm above the floor. Mice weighing 18–22 g were selected, and were handled by the investigator on alternate days to minimize stress. The animals were divided into 4 groups of six animals each, and they were given treatment as follows: Group 1: water, Group 2: diazepam (5 mg/kg), Group 3: EEMP (250 mg/kg) and Group 4: EEMP (500 mg/kg) orally. Each animal was positioned in the center of the maze facing one of the enclosed arms 1 hour after the medication treatment was administered orally. The following parameters were recorded during a five-minute session: the number of entries into the open arm and the time spent in the open arm [18-20]. To eliminate any olfactory cues, the maze was cleaned down with 70% ethyl alcohol and left to dry between observations.

Light and dark arena

The apparatus has been set as per design of previously reported method by Crawley and Goodwin (1980) [21]. A wooden box with an open top and two separate compartments, one painted black and the other white, is used, each brightly lit by a 100 W white light source located 17 cm above the box. The two compartments are linked by a small open doorway (7.5 × 5cm) in the middle of the partition on the floor level. The animals were given treatment as follows: Group 1: water, Group 2: diazepam (5 mg/kg), Group 3: EEMP (250 mg/kg) and Group 4: EEMP (500 mg/kg) orally for 3 days. On the 3rd day, animals were placed initially in light compartment and parameters such as number of entries and time spent in light area were recorded in triplicate.

Locomotor activity

Locomotor activity has been performed as per standard protocol using actophotometer [22]. Mice were divided into groups of 5 with 6 animals in each group and given medications in the manner outlined for the elevated plus maze paradigm. Locomotor activity was assessed as a number of photocells counts by individually putting the animals in an actophotometer for 10 minutes before and exactly 60 minutes after the relevant treatment. The change in the locomotor activity was derived using photocell counts recorded before and after the assigned treatments, and reduction in locomotor activity is calculated using the following equation:

$$\%\ \textbf{\textit{Reduction in locomotor activity}} = 100 - \frac{\textbf{\textit{Photocell counts after treatment}}}{\textbf{\textit{Photocell couns before treatment}}} \times 100$$

Biochemical Evaluation

Estimation of GABA in brain samples

Preparation of brain tissue samples

Mice were fasted up over night before being euthanized, and their brains were isolated and rinsed in cold 0.9 percent saline to remove attached tissues and blood clots. Using a tissue homogenizer, the brain tissues were homogenized with 0.1 N HCl in 80 percent ethanol (1 ml of ethanol for every 100 mg tissue). The homogenates were centrifuged for 20 minutes at 25° at 4500 rpm. The clean supernatants were then placed in microcentrifuge tubes and analyzed quantitatively through HPTLC [23].

Chromatographic conditions

Sample applicator- CAMAG Linomat 5; Scanner-CAMAG TLC scanner 3; Software-winCATS ver 1.14.26; Stationary phase-HPTLC plates silica gel 60 F 254; Mobile phase- n-butanol: glacial acetic acid: water (22:3:5 v/v/v); developing chamber- twin trough glass chamber (20 × 10 cm); developing mode-ascending mode; chamber saturation time-5 min; Detection reagent-0.2% w/v ninhydrin in acetone; Scanning wavelength-490 nm.

Histopathology

The isolated brain tissue was sliced and promptly fixed in 10% formalin solution for 24 hours. Dehydrated brain sections were paraffin-fixed, cut into 5 um thick slices, and stained with hematoxylin and eosin dye. A light microscope was used to examine the produced brain tissue slices [24].

Statistical analysis

The data was reported in the form of mean ± S.D. To examine statistical differences, one-way ANOVA was performed, followed by the post-Tukeys test. For all comparisons, $P<0.0001$ was considered statistically significant. All statistical analysis was performed using the Graph-Pad Prism 8.0.2 version.

Results

High Performance Liquid Chromatography

Mucuna pruriens ethanolic extract shows retention time at 2.503 mins along with other compounds at retention time of 3.75 and 5.07.

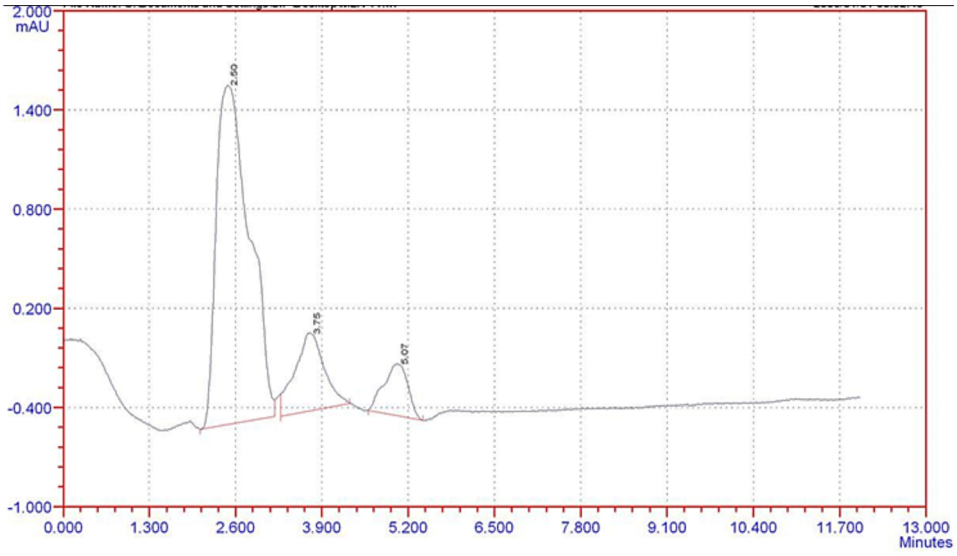


Figure 1. HPLC chromatogram of *Mucuna pruriens* ethanolic extract.

Anticonvulsant activity

Pentylenetetrazol induced convulsion

PTZ caused hind and forelimb myoclonic jerks in all mice within 20–30 seconds of intraperitoneal administration. This was followed by a collapse on one side or the back, followed by generalized clonic discharges. All the treated groups were compared with the control group. Effect of EEMP on PTZ induced epilepsy is shown in (Fig. 2). In control group, onset of clonus and onset of tonic was at (38.8 ± 2.1) and (73.1 ± 5.2)

seconds respectively with survival of 1 out of 6 animals. In diazepam treated group, onset of clonus and onset of tonic was not detectable with survival of all 6 animals. In EEMP (250 mg/kg) treated group, onset of clonus and onset of tonic was at (153.1 ± 5.9, $p < 0.0001$) and (190.3 ± 8.1, $p < 0.0001$) seconds respectively with survival of 2 out of 6 animals. EEMP (500 mg/kg) treated group, onset of clonus and onset of tonic was at (194.8 ± 5.3, $p < 0.0001$) and (235.6 ± 8.8, $p < 0.0001$) seconds respectively with survival of 2 out of 6 animals. EEMP administration significantly reduced the latency to clonic and tonic convulsions in a dose-dependent manner. Also, the EEMP intervention significantly reduced the severity of clonic convulsions. Furthermore, Pretreatment with EEMP reduced mortality and offered protection against PTZ-induced seizures.

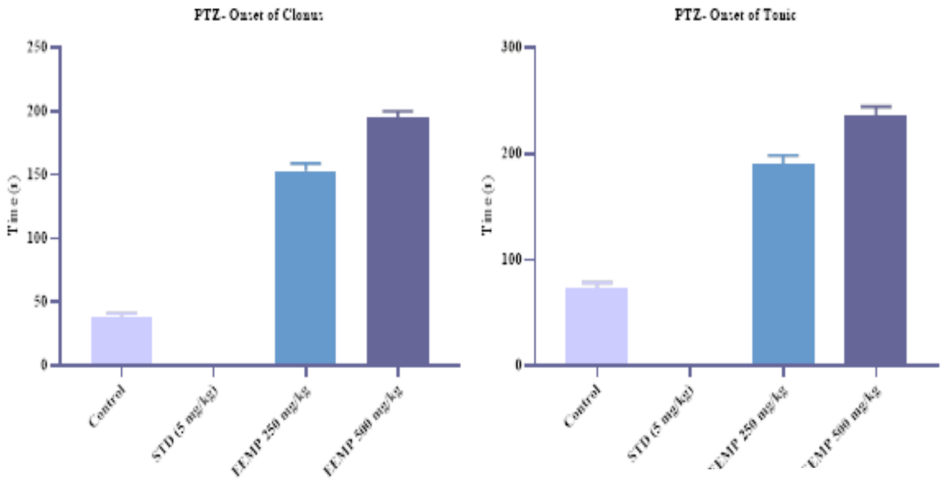


Figure 2. Effect of EEMP on PTZ-induced seizure activity in mice. Values are expressed as Mean ± SD for 6 animals per group.

Maximal electroshock induced convulsion

When compared to the control group, EEMP considerably reduced all convulsive phases induced by MES (tonic flexion phase, tonic extensor phase, clonic convulsion phase, and stupor). Similarly, mice administered with 25 mg/kg phenytoin were protected from MES-induced convulsions, as indicated by the absence of all convulsion phases. Effect of EEMP on MES induced convulsions is shown in (Fig. 3). The duration of HLTE (Hind Limb Tonic Extensor) and HLTF (Hind Limb Tonic Flexion) in control group was (18.1 ± 1.3) and (7.5 ± 0.9) seconds respectively with stupor at (128.5 ± 4.6) seconds. The duration of HLTE and HLTF in Phenytoin treated group was not detectable with stupor at (49.3 ± 2.7, $p < 0.0001$) seconds. In EEMP

(250 mg/kg), the duration of HLTE and HLTF was (5.3 ± 1.1, $p < 0.0001$) and (5.8 ± 0.8, $p < 0.0001$) seconds respectively with stupor at (88.3 ± 3.4, $p < 0.0001$) seconds. In EEMP (500 mg/kg), the duration of HLTE and HLTF was (4.8 ± 0.6, $p < 0.0001$) and (4.6 ± 0.7, $p < 0.0001$) seconds respectively with stupor at (67.5 ± 4.3, $p < 0.0001$) seconds. In the MES control group, no animals were recovered, whereas phenytoin administration resulted in complete recovery (100%) of all mice. At the same time, three-fourth of mice treated with EEMP recovered from MES.

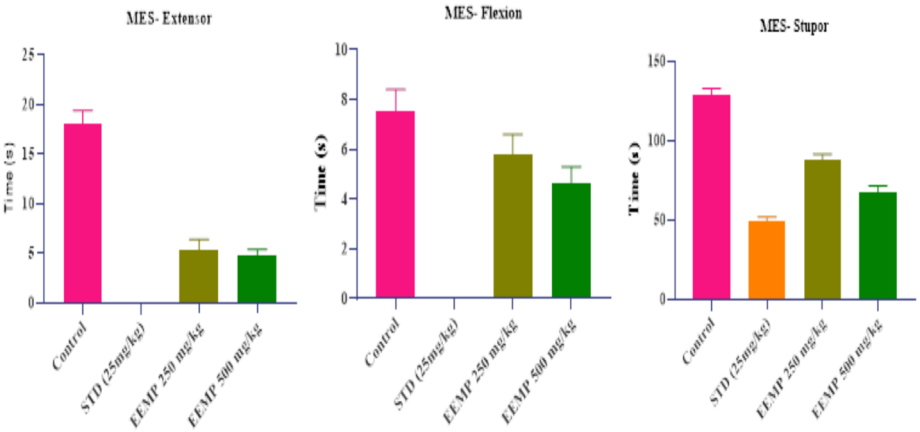


Figure 3. Effect of EEMP on MES-induced convulsions. Values are expressed as Mean ± SD for 6 animals per group.

Locomotor activity

As shown in Fig. 4, Control group didn't produce much change in locomotor activity (297.5 ± 10.2 - 283.5 ± 41.05). Both doses of EEMP 250 and 500 mg/kg exhibited less effectively reduction in locomotor activity (277.5 ± 61.5 - 261 ± 62.7, $p > 0.05$) and (296.1 ± 62.9 - 274.1 ± 37.9, $p > 0.05$) respectively. Diazepam (5 mg/kg, p.o) was used as a standard drug, which showed marked reduction in the locomotor activity from (250.1 ± 39.3, $p > 0.05$ - 126.6 ± 22.9, $p < 0.0001$). However, it can be concluded that EEMP did not severely affect the locomotor activity of mice after treatment.

Anxiolytic activity

Elevated plus maze model

The control animals preferred the closed (dark) arms and displayed anxiety-like signs such as immobility, freezing, and feces while entering the open arms. In control group, time spent and entries in open arm are (43.1 ± 4.9) (3 ± 0.8) respectively. In diazepam

treated group, time spent and entries in open arm are (239.8 ± 3.1, $p < 0.0001$) (12.5 ± 1.7, $p < 0.001$) respectively. The EEMP-treated animals (250 and 500 mg/kg, p.o) spent much more time, viz (177.5 ± 3.4, $p < 0.0001$) (6.1 ± 1.06, $p < 0.0001$) and (215.8 ± 3.4, $p < 0.0001$) (10.8 ± 1.06, $p < 0.0001$) (Fig. 5).

Light and Dark

Rodents in the light and dark arenas prefer to avoid entering and limit spontaneous exploratory behavior in the highly lighted region, which is a typical inclination when animal is introduced to an unusual environment [25]. Anxiety tends to show an increase in the number of entries and time spent bright arena (7.5 ± 0.95) (62.34 ± 10.66). The results given in fig. 6 indicate that the diazepam (5.0 mg/kg) treated mice showed a highly significant ($p< 0.0001$) increase in the number of bright chamber entries and time spent in bright arena compared to control group (10 ± 1.15) (120.50 ± 7.24). EEMP 250 mg/kg treated mice increased the number (8.16 ± 0.68, $p > 0.05$) and time spent (9.33 ± 0.94, $p < 0.0001$) in the bright arena. EEMP 500 mg/kg treated mice also significantly increased the number (107.90 ± 1.61, $p < 0.0001$) and time spent (116.20 ± 2.69, $p < 0.0001$) in the light compartment.

Brain GABA estimation

PTZ administration and MES model significantly reduced brain GABA levels in positive control mice compared to normal control animals. EEMP intervention dose-dependently restored brain GABA levels (Table 1) and Fig. 7.

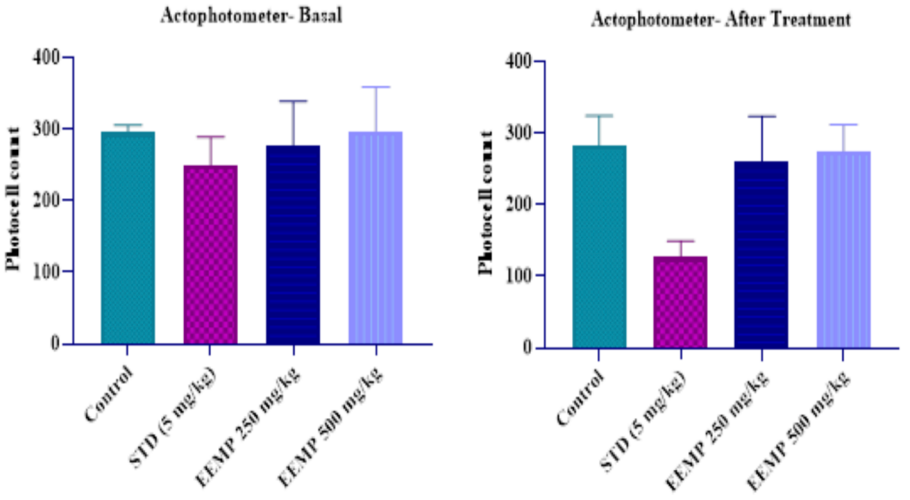


Figure 4. Effect of EEMP on locomotor activity (Actophotometer) in mice.

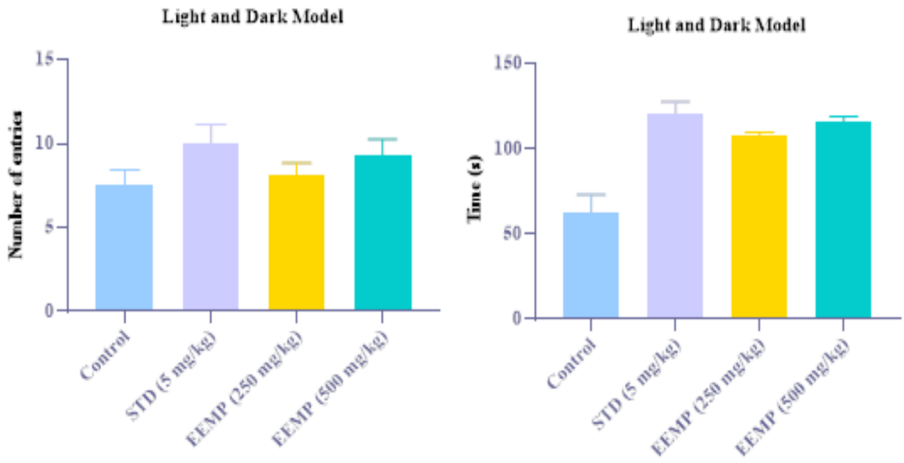


Figure 6. Effect of EEMP on light and dark model in mice.

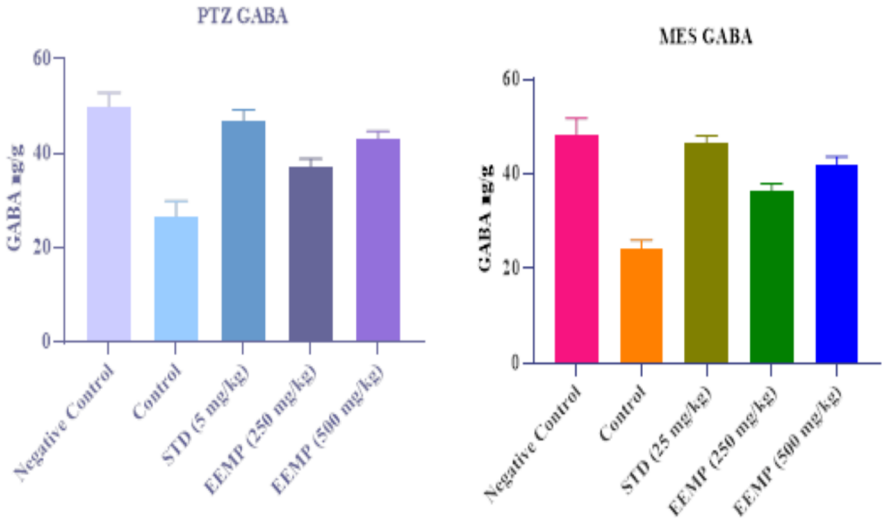


Figure 7. Effect of PTZ and MES on GABA.

Table 1. Effect of EEMP on GABA levels in mice brains.

Treatment Groups	GABA levels (ng/g of brain tissue)	
	PTZ	MES
Negative Control	48.43 ± 3.36	49.91 ± 2.96
Positive Control	24.33 ± 1.76	26.4 ± 3.29
STD (5 mg/ kg) Diazepam	46.37 ± 1.72	-
STD (25 mg/ kg) Phenytoin	-	46.97 ± 2.29
EEMP (250 mg/kg)	36.25 ± 1.72	37.11 ± 1.78
EEMP (500 mg/kg)	42.03 ± 1.66	43.04 ± 1.66

Histopathology

Figure 8 shows photomicrographs of section of brain of PTZ induced convulsion in mice. In negative control mice brain section, normal cells were noticed with natural architecture (8a). However, brain tissue from the positive control group showed neuronal loss after PTZ injection, with the histological variations observed like degeneration of pyramidal cells, necrosis and pyknosis, and degeneration of neurons (8b). Animal groups treated with standard drug (8c) and EEMP 500 mg/kg (8e) exhibits significant neuroprotective action as confirmed by protected neuronal structures and normal architecture with high neuronal density while in case of animal group treated with EEMP 250 mg/kg, generation of glial cells along with mild infiltration of pyramidal cells have been observed (8d).

Figure 9 illustrates the photomicrographs of the transverse sections of brain of MES induced convulsion in mice. Negative control group animal brains showed normal hilar neuronal cells without edema or cerebral congestion (9a). In the positive control group MES (50 mA, 0.20 s) delivered through auricular electrodes results a massive neuronal injury in all hippocampal segments showed neuronal loss along with marked cerebral congestion, and moderate infiltration (9b). Brain tissue in animals treated with standard drugs (9c) and EEMP 500 mg/kg (9e) exhibits gliosis having round nuclei and prominent nucleoli. There was no cerebral congestion or edema observed. Brain section from animals treated with EEMP 250 mg/kg exhibited trivial cerebral congestion or cerebral edema. The shrunken, argyrophilic neurons with glial cells are intermixed with apparently normal cells (9d).

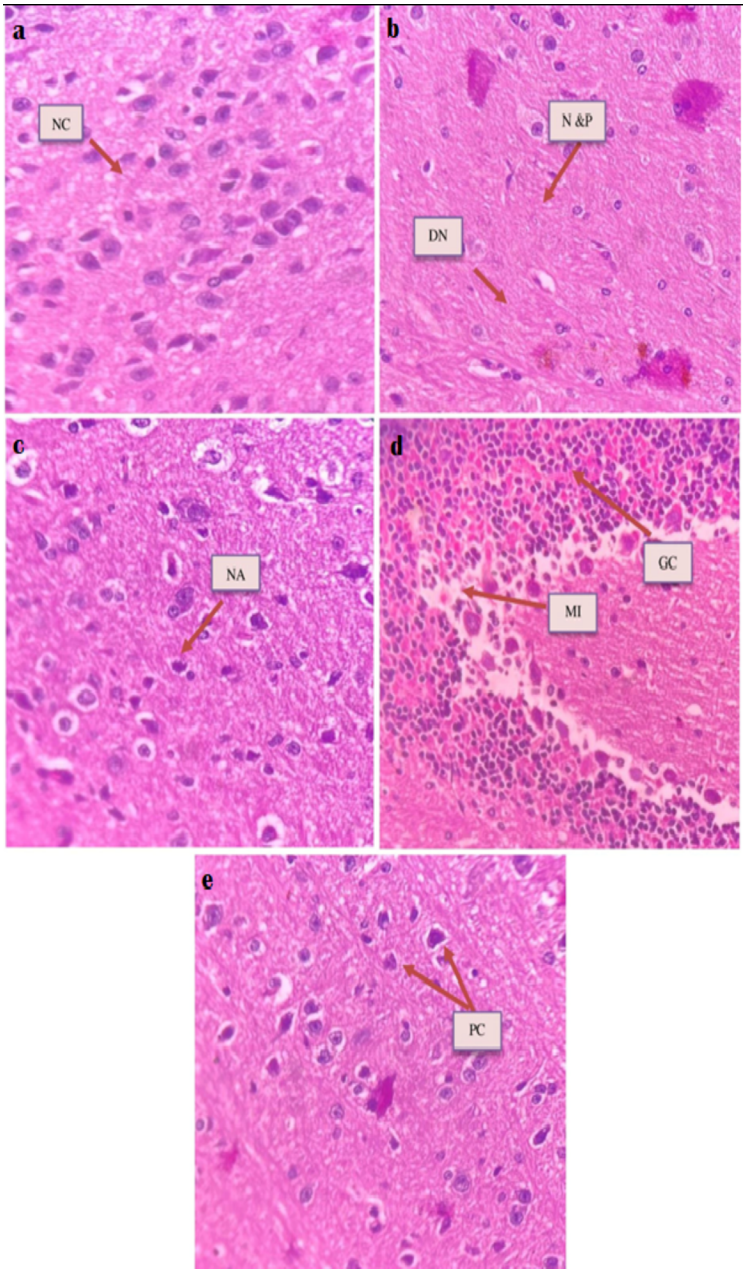


Figure 8. Photomicrographs of mice brain tissue (40x) in PTZ-model; a) Negative control; b) Positive control; c) Standard (5 mg/kg); d) EEMP 250 mg/Kg; e) EEMP 500 mg/Kg. Abbreviations: NA (Normal architecture); NC (Normal cells); DN (Disruption of neurons); MI (Moderate infiltration); GC (Glial cells); N & P (Necrosis & Pyknosis); PC (Pyramidal cells).

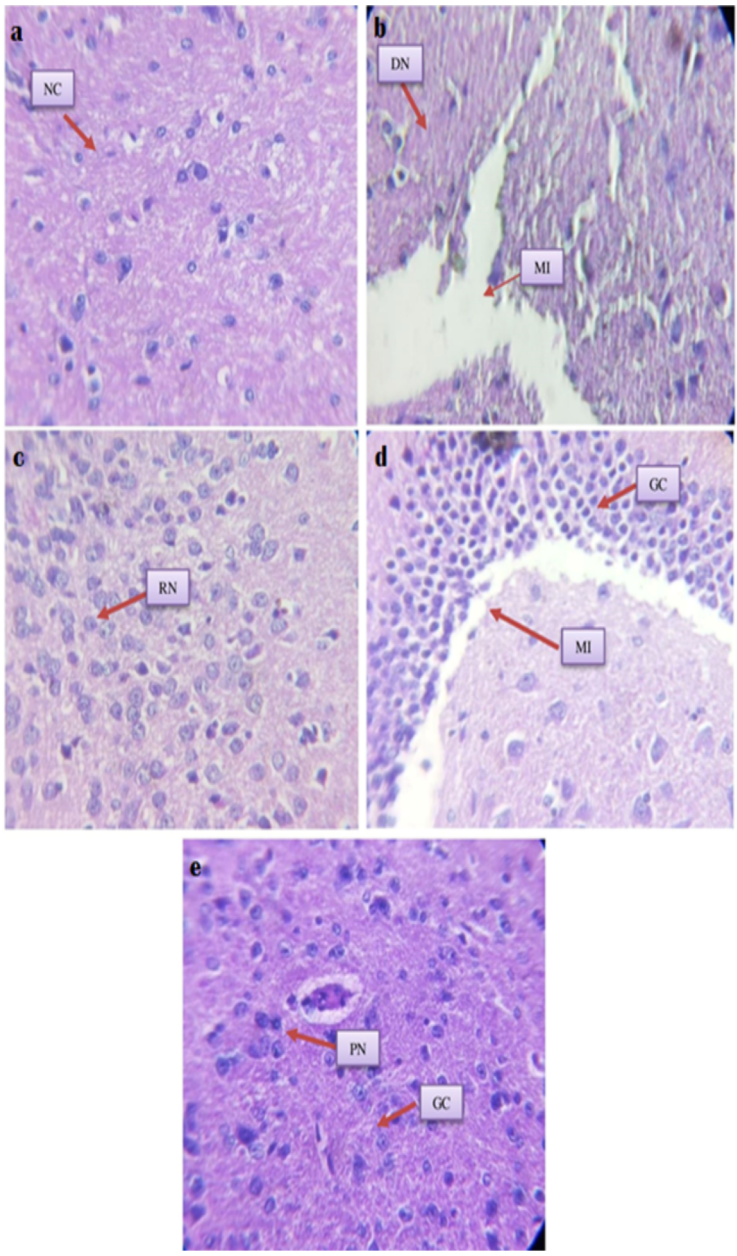


Figure 9. Photomicrographs of mice brain tissue (40x) in MES-model; a) Negative control; b) Positive control; c) Standard (25 mg/kg); d) EEMP 250 mg/Kg; e) EEMP 500 mg/Kg. Abbreviations: NC (Normal cells); DN (Disruption of neurons); MI (Moderate infiltration); GC (Glial cells), RN (Round nuclei); PN (Prominent nucleoli)

Discussion

Fear and anxiety are described as a victim's reaction to actual or specific dangers that may potentially harm its homeostasis. This reaction might be physiological or behavioral in nature. A few basic anxiety animal models, such as the elevated plus maze and the light dark model, have been used to measure anxiety-like behavior in mice. All of these therapies rely on subjecting the patient to unexpectedly unpleasant surroundings [26]. Epilepsy is one of the most common and serious brain illnesses. The term "seizure" refers to a brief change in behavior induced by chaotic, coordinated, and rhythmic firing of groups of brain neurons [27]; epidemiologic studies reveal that the prevalence and significance of epilepsy cannot be overstated. Most studies, however, have concluded that the average incidence of epilepsy in affluent countries is around 50 cases per 100,000 individuals per year, and that it rises rapidly with age [28]. The majority of anticonvulsant action in mice has been assessed using a few traditional animal models, such as PTZ-induced convulsions and MES-induced convulsions [29, 30].

Drugs that enhance brain GABA content, as well as the administration of centrally active GABA mimic agents, have been proven in studies to be a successful therapeutic method for the treatment of epilepsy. As a result, to determine the effect of the extract on GABA levels in the brain, the animals were treated with the extracts and GABA levels were determined using the HPTLC technique [24]. The ethanolic extract of seeds of *Mucuna pruriens* was tested for anxiolytic and anticonvulsant activity in the current study utilizing experimental models such as elevated plus maze test, light and dark test, locomotor activity by actophotometer, and anticonvulsant activity was studied using pentylenetetrazol induced convulsions and MES produced convulsions, followed by GABA estimate in mice brain tissues. The raised plus maze is presently one of the most extensively used animal anxiety models [18-20]. The test is essentially based on the observation that exposing an animal to an elevated maze array results in a considerably larger approach-avoidance conflict than exposing the animal to an open maze array. When exposed to a new environment, animals shun open entrance and prefer to remain in closed arms. The EEMP significantly increased the time spent and number of admissions into the open arm of our study, indicating that the test drugs may reduce fear and anxiety in mice. A considerable increase in efforts to enter the bright arena by EEMP treated mice in a dosage dependent manner may reflect an attempt to overcome the inhibition that is experienced under normal conditions.

In the pentylenetetrazol induced convulsions model, EEMP (250 and 500 mg/kg) significantly increased the onset of clonus, onset of tonus, and percentage protection when compared to the control group, whereas in the MES induced convulsions model,

EEMP (250 and 500 mg/kg) significantly decreased the duration of tonic extensor. GABA appears to be important in the pathogenesis of several neuropsychiatric disorders. Many traditional drugs used to treat mental illnesses are known to work in part by enhancing GABA activity, whilst some novel substances may have therapeutic advantages entirely through GABAergic actions. In this current study, three days of EEMP (250 and 500 mg/kg) treatment followed by GABA quantification demonstrated a significant rise in GABA levels in the brain that upturned the symptoms produced by MES and PTZ when compared to the control group. Histopathological studies also justify the antiepileptic and anxiolytic effect of EEMP as seen in Fig. 8 and Fig. 9 that in extract treated group of both the models of PTZ and MES, the neuronal loss was not present as compared to positive control group.

Conclusion

Mucuna pruriens may offer adequate protection against epileptic seizures, implying that it might be utilized to treat petitmal and grandmal epilepsy. This gives justification for its usage in traditional medicine to treat epilepsy and anxiety. Our findings are preliminary on the basis of preclinical studies, and further exhaustive research is required on mechanistic basis in future.

Acknowledement

Authors would like to express their gratitude to Dr Alok Mukherjee, principal of United Institute of Pharmacy, Naini, Prayagraj, India, for providing animal house facility, Mrs. Neha Chawla of Arbro Pharmaceuticals Pvt. Ltd. New Delhi, India for performing HPTLC Fingerprinting, Mr. Avinash Gupta of United Diagnostics for performing Histopathology.

Funding

None to declare.

Conflict of interest

None to declare

Ethics approval

This research approved by Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) of United institute of Pharmacy with approval no. UIP/IAEC/Nov.-2021/14.

References

1. V.D. Thakur, S.A. Mengi, Neuropharmacological profile of *Eclipta alba* (Linn.) Hassk, *J. Ethnopharmacol.*, **102**(1), 23-31 (2005).

2. M. Emamghoreishi, M. Khasaki, M.F. Aazam, *Coriandrum sativum*: Evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze, *J. Ethnopharmacol.*, **96**(3), 365-370 (2005).

3. M.G. Magaji, A.H. Yaro, A.M. Musa, J.A. Anuka, I. Abdu-Aguye, I.M. Hussaini, Central depressant activity of butanol fraction of *Securinega virosa* root bark in mice, *J. Ethnopharmacol.*, **141**(1), 128-133 (2012).

4. J.S.S. Quintans, A.R. Antoniolli, J.R.G.S. Almeida, V.J. Santana-Filho, L.J. Quintans-Júnior, Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **114**(6), 442-450 (2014).

5. M. Pugalenthi, V. Vadivel, P. Siddhuraju, Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis--a review, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **60**(4), 201-218 (2005).

6. R.A. Vaidya, A.R. Sheth, S.D. Aloorkar, N.R. Rege, V.N. Bagadia, P.K. Devi, *et al.*, The inhibitory effect of the cowhage plant-*Mucuna pruriens*-and L-dopa on chlorpromazine-induced hyperprolactinaemia in man, Neurol. India, **26**(4), 177-178 (1978).

7. G. Hussian, B.V. Manyam, *Mucuna pruriens* proves more effective thanl-DOPA in Parkinson's disease animal model, *Phytother. Res.*, **11**(6), 419-423 (1997).

8. B.V. Manyam, M. Dhanasekaran, T.A. Hare, Neuroprotective effects of the anti-parkinson drug *Mucuna pruriens*, *Phytother. Res.*, **18**(9), 706-712 (2004).

9. L. Sathiyanarayanan, S. Arulmozhi, *Mucuna pruriens* Linn. - A comprehensive review, *Pharmacognosy Reviews*, **1**(1), 157-162 (2007).

10. M.C. Pant, L.D. Joshi, Identification of pharmacologically active substances in the seeds of Mucuna pruriens (Abs), In: *Proceedings of Annual Conference of Indian Pharmacological Society*, Lucknow, India, 1970, p. 24.

11. C.K. Kokate, *Practical Pharmacognosy*, Vallabh Prakashan, New Delhi, India, 1994, pp 107-109.

12. B.G. Rathod, N.M. Patel, Development of validated RP-HPLC method for the estimation of L-Dopa from *Mucuna pruriens*, its extracts and in Aphrodisiac formulation, *Int. J. Pharma Sci. Res.*, **5**(8), 508-513 (2014).

13. A.H. Gavishiddappa, S.D. Desai, P. Biradar, H.M. Nanjappaiah, H. Shivakumar, B.B. Ishwar, **Evaluation of acute oral toxicity and phytoconstituents of methanolic extract of** *Mucuna pruriens***,** *J. Pharm. Sci. & Res.*, **7**(1), 33-36 (2015).

14. A.B. Krishna, H.K. Manikyam, V.K. Sharma, N. Sharma, Acute oral toxicity study in rats with *Mucuna pruriens* seed extract, *Asian J. Plant Sci. Res.*, **6**(2), 1-5 (2016).

15. S. Golbabapour, M. Hajrezaie, P. Hassandarvish, N.A. Majid, A.H.A. Hadi, N. Nordin, *et al.*, Acute toxicity and gastroprotective role of *M. pruriens* in ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 974185 (2013).

16. A. Showraki, M. Emamghoreishi, S. Oftadegan, Anticonvulsant effect of the aqueous extract and essential oil of *Carum carvi* L. seeds in a pentylenetetrazol model of seizure in mice, *Iran. J. Med. Sci.*, **41**(3), 200-208 (2016).

17. H.G. Vogel, W.H. Vogel, *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, Springer, 2000, pp. 230-244.

18. S. Pellow, S.E. File, Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **24**(3), 525-529 (1986).

19. S. Hogg, A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **54**(1), 21-30 (1996).

20. R.J. Rodgers, N.J. Johnson, Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **59**(1), 221-232 (1998).

21. J. Crawley, F.K. Goodwin, Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **13**(2), 167-170 (1980).

22. J.S. Sancheti, M.F. Shaikh, P.F. Khatwani, S.R. Kulkarni, S. Sathaye, Development and validation of a HPTLC method for simultaneous estimation of L-glutamic acid and γ-aminobutyric acid in mice brain, *Indian J. Pharm. Sci.*, **75**(6), 716-721 (2013).

23. Z. Kazmi, S. Zeeshan, A. Khan, S. Malik, A. Shehzad, E.K. Seo, *et al.*, Anti-epileptic activity of daidzin in PTZ-induced mice model by targeting oxidative stress and BDNF/VEGF signaling, *Neurotoxicology*, **79**, 150-163 (2020).

24. A.E. Arrant, N.L. Schramm-Sapyta, C.M. Kuhn, Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats, *Behav. Brain Res.*, **256**, 119-127 (2013).

25. R.S. Fisher, W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, *et al.*, Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE), *Epilepsia*, **46**(4), 470-472 (2005).

26. C. Belzung, G. Griebel, Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review, *Behav. Brain Res.*, **125**(1-2), 141-149 (2001).

27. A.E. Cavanna, Epilepsy and disorders of consciousness, *Behav. Neurol.*, **24**(1), 1 (2011).

28. E. Beghi, The epidemiology of epilepsy, *Neuroepidemiology*, **54**(2):185-191 (2020).

29. V. Bhosle, Anticonvulsant and antioxidant activity of aqueous leaves extract of *Desmodium triflorum* in mice against pentylenetetrazole and maximal electroshock induced convulsion, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **23**(4), 692-698 (2013).

30. A.M. Alshabi, I.A. Shaikh, S.M.B. Asdaq, The antiepileptic potential of *Vateria indica* Linn in experimental animal models: Effect on brain GABA levels and molecular mechanisms, *Saudi J. Biol. Sci.*, **29**(5), 3600-3609 (2022).

How to cite this article

S.B. Mishra, D.R. Sharma, S. Singh, *Mucuna pruriens* (Velvet bean) seed extract ameliorates epilepsy and anxiety against in vivo experimental models: A histopathological analysis, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(1), 228-249 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103333

Scientific research article / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103423*

Modulation of IL-6 in ameliorating arthritic conditions in rats by *Rosa alba* L flower extract and fraction

Man Singh[1,2]*, Danish Ahmed[2], Himanshu Pandey[3], Rahul Deo Yadav[1,2], Shradhanjali Singh[4], Shanti Bhushan Mishra[4]

[1] Department of Pharmacy, MLN Medical College, Prayagraj 211001, India.

[2] Department of Pharmaceutical Sciences, Sam Higginbottom University of Agriculture, Technology and Sciences, Prayagraj 211008, India.

[3] Centre for Teacher Education, Central Institute of Higher Tibetan Studies, Sarnath, Varanasi, 221007, India.

[4] United Institute of Pharmacy, A 31/1, UPSIDC, Industrial Area Naini, Prayagraj 211010, India.

*Corresponding Author: mlnpharmacy1969@gmail.com

Received: July 1, 2022

Corrected: September 16, 2022

Accepted: September 19, 2022

Summary

Introduction: rheumatoid arthritis characterized by joint inflammation and pain, affecting millions of peoples around the world. Traditional system of medicine had proven to be preventive and treating physical and mental illness. **Objective:** the objective of the study is to assess anti-arthritic potential of the plant *Rosa alba* L by considering CFA, formaldehyde and turpentine oil induced arthritic model. **Material and Method:** ethanolic extract and its ethyl acetate fraction were considered for the study and quercetin was quantitatively estimated by high performance thin layer chromatographic (HPTLC) method. Moreover, hematological and biochemical studies (IL-6) were performed in blood and serum of wistar albino rat. Then histopathological studies had also been performed on rat hind paw joint. **Result:** phytochemical screening estimated the presence of carbohydrates, phenolic compounds, flavonoids, phytosterols, amino acids and fixed oil in ethanolic extract and ethyl acetate fraction of the plant. Amount of quercetin in the flowers of the plant was found to be 0.26% w/w by quantitative HPTLC method. The level of proinflammatory cytokines, interleukin (IL-6) was considerably decreased ($p<0.001$) in the fraction treated group of rats at 400 mg/kg b.w by considering complete freund's adjuvant (CFA) induced arthritic

model. **Conclusion:** Ameliorated hematological, biochemical and histopathological parameters confirmed the antiarthritic potential of the plant.

Keywords: Complete freund's adjuvant, histopathology, HPTLC, interleukin, quercetin.

Resumen

Modulación de IL-6 en la mejora de afecciones artríticas en ratas por extracto y fracción de flor de *Rosa alba* L

Introducción: artritis reumatoide caracterizada por inflamación y dolor articular, que afecta a millones de personas en todo el mundo. El sistema tradicional de medicina había demostrado ser preventivo y tratar enfermedades físicas y mentales. **Objetivo**: el objetivo del estudio es evaluar el potencial antiartrítico de la planta *Rosa alba* L considerando el modelo artrítico inducido por CFA, formaldehído y aceite de trementina. **Material y método**: el extracto etanólico y su fracción de acetato de etilo se consideraron para el estudio y la quercetina se estimó cuantitativamente mediante el método cromatográfico en capa fina de alto rendimiento (HPTLC). Además, se realizaron estudios hematológicos y bioquímicos (IL-6) en sangre y suero de rata albina wistar. A continuación, también se realizaron estudios histopatológicos en la articulación de la pata trasera de rata. **Resultado**: el cribado fitoquímico estimó la presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, fitoesteroles, aminoácidos y aceite fijo en el extracto etanólico y la fracción de acetato de etilo de la planta. Se encontró que la cantidad de quercetina en las flores de la planta era del 0,26% p / p por el método de HPTLC cuantitativo. El nivel de citocinas proinflamatorias, interleucina (IL-6), disminuyó considerablemente ($p<0,001$) en el grupo de ratas tratado con fracción a 400 mg/kg de peso corporal considerando el modelo artrítico inducido por adyuvante de Freund (CFA) completo. **Conclusión**: la mejora de los parámetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos confirmó el potencial antiartrítico de la planta.

Palabras clave: Adyuvante completo de Freund, histopatología, HPTLC, interleucina, quercetina.

Resumo

Modulação de IL-6 na melhora de condições artríticas em ratos por extrato e fração de flor de *Rosa alba* L

Introdução: artrite reumatóide caracterizada por inflamação e dor nas articulações, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. O sistema tradicional de medicina provou ser preventivo e tratamento de doenças físicas e mentais. **Objetivo:** avaliar o potencial antiartrítico da planta *Rosa alba* L, considerando o modelo artrítico induzido por CFA, formaldeído e óleo de terebintina. **Material e Método:** o extrato etanólico e sua fração acetato de etila foram considerados para o estudo e a quercetina foi estimada quantitativamente pelo método de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC). Além disso, estudos hematológicos e bioquímicos (IL-6) foram realizados em sangue e soro de ratos wistar albinos. Em seguida, estudos histopatológicos também foram realizados na articulação da pata traseira do rato. **Resultado:** a triagem fitoquímica estimou a presença de carboidratos, compostos fenólicos, flavonoides, fitoesteróis, aminoácidos e óleo fixo no extrato etanólico e na fração acetato de etila da planta. A quantidade de quercetina nas flores da planta foi de 0,26% p/p pelo método quantitativo de HPTLC. O nível de citocinas pró-inflamatórias, interleucina (IL-6) foi consideravelmente diminuído ($p<0,001$) no grupo de ratos tratados com fração a 400 mg/kg b.w, considerando o modelo artrítico induzido por adjuvante completo de Freund (CFA). **Conclusão:** a melhora dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos confirmou o potencial antiartrítico da planta.

Palavras-chave: Adjuvante completo de Freund, histopatologia, HPTLC, interleucina, quercetina.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is indicated as an autoimmune ailment concerned with the soreness in the joints, cartilage devastation and synovial intensification. Nowadays, broader therapeutic choices including Janus kinase inhibitors, disease modifying antirheumatic drugs (DMARD's), biologic agents were likely to be used for the treatment. However early diagnosis, intensive therapy considered to be useful for the treatment [1]. Globally, 20 million cases consider prevalent cases, 1.2 million cases consider incident cases and 3.4 million cases consider disability adjusted life years (DALYs) [2].

Traditional medicines and therapy being a holistic health care system treats certain class of problems resulting in overall wellbeing apart from complementary and alternative medicines (CAM) systems which aims on cause and prevention [3]. Hence, medicinal plants and derived molecules can decrease the manifestation related to RA. The plant *Rosa alba* L is considered to be an aromatic shrub which is medicinally and commercially used due to its oils and volatile products. The aromatic water made from the plant is used as a flavoring agent in the preparation of jam, cake, and drinks [4]. Several scientific approaches determined that *R. alba* exhibits various pharmacological activities including antioxidant [5], antimicrobial [6], antifertility and teratogenic activity [7], cytotoxic and genotoxic activity [8], memory enhancing activity [9] stress induced skin barrier disruption activity [10], bradykinin antagonist activity [11]. Chemically the plant contains geraniol, heneicosane, nonadecane, citronellol, linalool, β phenylethyl alcohol, nerol, neral, geranial, eugenol, methyleugenol, nonadecene, eicosane, and tricosane [12], tannins, ellagitannins, and flavonoids [13], aliphatic hydrocarbons, minerals, alcohols, aldehydes, monoterpenoids, sesqiterpene, benzyl benzoate, allo-aromadendrene, β selinene [14]. Traditionally the flowers of the plant claimed for lessening inflammation, treating cold and catarrh of nose, treating diseases of the lungs, opthalmia and rheumatism [15].

Despite the above-mentioned pharmacological action, no antiarthritic activity has been explored for the plant, thus the current work aims to explore the antiarthritic potential of *Rosa alba* L flower extracts and fractions in acute and chronic arthritic models.

Materials and methods

Plant collection

The flowers of the *Rosa alba* L were collected from herbal garden of United Institute of Pharmacy, Naini, Prayagraj in the month of March 2019 and air-dried at 40 °C. The plant was authenticated by taxonomist Dr. Arti Garg from Botanical Survey of India, Prayagraj and voucher specimen has been submitted in departmental herbarium of BSI with Accession No. 104698. Grind the air-dried material into coarse powder, again air dried under shade and kept in closed container.

Drugs, chemicals and instruments

Complete Freund's adjuvant (CFA) was purchased from Sigma-Aldrich, USA. Aspirin was obtained from central drug house (CDH), New Delhi, as a gift sample. Sodium chloride, turpentine oil, formaldehyde and other chemicals and solvents taken are AR grade and were purchased from Merck specialties Pvt ltd., Mumbai. The instru-

ments for experiment used were Plethysmometer (Orchid Scientific), Vernier caliper (Mumbai tool centre), CAMAG HPTLC system (Mutenz, Switzerland) comprising of Hamilton 100 µl syringe, Linomat IV applicator, twin trough developing chamber (20 × 20 cm).

Extraction and fractionation

The powdered material of dried flowers of *Rosa alba* (500 g) were macerated with petroleum ether to remove fatty substances; the marc was further exhaustively extracted with of 50% ethanol by continuous extraction process in Soxhlet assembly at 50 °C - 60 °C. The obtained semi solid plant extract have been subjected for drying on water bath under controlled conditions and then store in air tight container in a desiccator. Thus 80.8 g of solid residue (yield 39.8% w/w) was obtained. Fractionation was made by amalgamating 100 g of relic with water and chloroform, ethyl acetate, methanol and aqueous (1:1) by considering successive liquid–liquid partitioning method in a separating funnel. The chloroform (RACF), ethyl acetate (RAEA), methanol (RAM) and aqueous fractions (RAAF) fractions were obtained and intensified considering rotavapor (Buchi, USA) at <400^{0}C. The yield of ethyl acetate fraction was 40.6% w/w.

Preliminary phytochemical screening and TLC

RAEE and RAEA were tested for preliminary phytochemical screening and thin layer chromatography (TLC) considering Silica Gel 60 to be stationary phase by using standard procedures [16]. Under UV chamber at 254 nm, 365 nm and visible light the plates were experimented for spots considering Toluene: ethyl acetate: formic acid (8:1:1 v/v/v) in visible light. RAEE showed (04) spots and subjected for further fractionation. Then ethyl acetate (RAEA), chloroform (RACF), methanol (RAMF) and aqueous (RAAF) fractions were also tested. In RAEA, four spots were observed at visible hence considered for anti-arthritic activity.

Characterization of ethanolic extract and its fraction

The ethanolic extract and ethyl acetate fraction were analyzed qualitatively by HPTLC fingerprinting method. 10 µl of 50% ethanolic extract (RAEE) and its ethyl acetate fraction (RAEA) were spotted on HPTLC plates. The plates were developed at 580nm using mobile phase Toluene: ethyl acetate: formic acid (8:1:1 v/v/v).

Experimental animals

Young healthy male albino wistar rats weighing 180-210 g were kept in polypropylene cages for 12 h light and 12 h dark cycle at 25 ±2 °C in the animal facility of United Institute of Pharmacy, Allahabad. Prior the experiment all animals were acclimatized for five days and fed with standard laboratory pellet diet and water ad libitum. The

experimental protocol was approved by the Institutional Animal Ethical Committee of United Institute of Pharmacy with approval number UIP/IAEC/Nov.-2020/08**.**

Toxicity study of the plant

The lethal median dose (LD50) assessment was performed in rats by OECD guidelines [17]. A single dose of the extract (5, 50, 300, 2000 and 5000 mg/kg) in 1% gum acacia was given orally by gavage to different group of animals (three each). The animals were regularly observed every hour during the first 12 h throughout the study period (14 days) for any abnormal changes.

Experimental induction of arthritis

Arthritis was induced intraplantarally in left hind paw after 30 min of drug/vehicle administration to all the rats. Suspensions of Standard drug aspirin, extract and its fractions were prepared in 1% w/v gum acacia and administered orally to rats. Formaldehyde solution (2% v/v) and Turpentine emulsion (10% v/v) were made in 0.9% saline.

Acute arthritic model

Seven groups of rats (n=6) were used for the study. Group I considered as positive control rats, given vehicle, Group II considered as arthritic control rats given 0.1 ml of 2% formaldehyde solution and 0.1 ml 10% v/v turpentine oil emulsion, Group III was arthritic rats treated with the standard drug aspirin at 100 mg/kg body weight, Group IV was arthritic rats treated with extract (RAEE) 200 mg/kg body weight, Group V was arthritic rats treated with extract (RAEE) 400 mg/kg body weight, Group VI was arthritic rats treated with fraction (RAEA) 200 mg/kg body weight, Group VII was arthritic rats treated with fraction (RAEA) 400 mg/kg body weight.

On day 0, 2, 4, 6, 8, and 10, the anti-arthritic activity of RAEE and RAEA was assessed on the injected paw using the parameters paw volume and joint diameter on formaldehyde induced arthritic model.

RAEE and RAEA evaluated for anti-arthritic activity by measuring paw volume and joint diameter every hour for up to 6 hours on turpentine induced arthritic model.

Chronic arthritic model

Complete Freund's adjuvant arthritic model

Anti-arthritic activity of RAEE and RAEA was evaluated on injected paw on the following parameters paw volume, joint diameter, body weight on day 0, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, and day 28. Inference of various parameters were considered by withdrawing the blood by retro-orbital puncture on 28th day.

Hematological and serum parameters

Blood of the rats was withdrawn by retro-orbital puncture on 28th day. The collected blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 15 min. The serum was collected in fresh serum tubes and stored in refrigerator (2-4 °C) after tightly capped and subjected to biochemical and hematological examination for AST, ALT, ALP levels, red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count, haemoglobin (Hb), and platelets (PLT). Serum C-reactive protein (CRP), Rheumatoid factor (RF) an interleukin (IL-6) level. The parameters were also measured using diagnostic kits (Erba Lachema).

Histopathological analysis

The control as well as treated rats were sacrificed by using cervical dislocation and the ankle joint was removed, immediately fixed in bouin's fluid for 24 h and washed in running tap water to remove colour of bouin's fluid and dehydrated in alcohol embedded in paraffin and cut at 5 μm in a rotary microtome. The joint sections were then deparaffinized in xylene and stained with eosin-haematoxylin stain and viewed under 40X magnifications. The snaps of histopathological slides were captured with a Nikon E400 microscope (Chiyoda, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Data was expressed as mean±SD and statistical analysis was carried out by using GraphPad Prism 9.1.2 software by applying two-way ANOVA with Newman-Keuls method. A $p<0.001$ was considered to be significant.

Results

Phytochemical analysis

Carbohydrates, phenolic compounds, flavonoids, phytosterols, amino acids and fixed oil were present in 50% *Rosa alba* ethanolic extract and *Rosa alba* ethyl acetate fraction.

Toxicity of the plant extract

Rosa alba ethanolic extract (RAEE) and *Rosa alba* ethyl acetate (RAEA) fraction did not exhibit any toxicity and mortality when oral dosing was done up to 5000 mg/kg. Hence, two treatment doses were selected i.e., 200 mg/kg and 400 mg/kg b.w.

High-performance thin layer chromatography fingerprinting analysis

The Quantitative estimation of quercetin was performed considering ethyl acetate fraction of *Rosa alba* L at 580 nm using Toluene: ethyl acetate: formic acid (8:1:1 v/v/v) as the

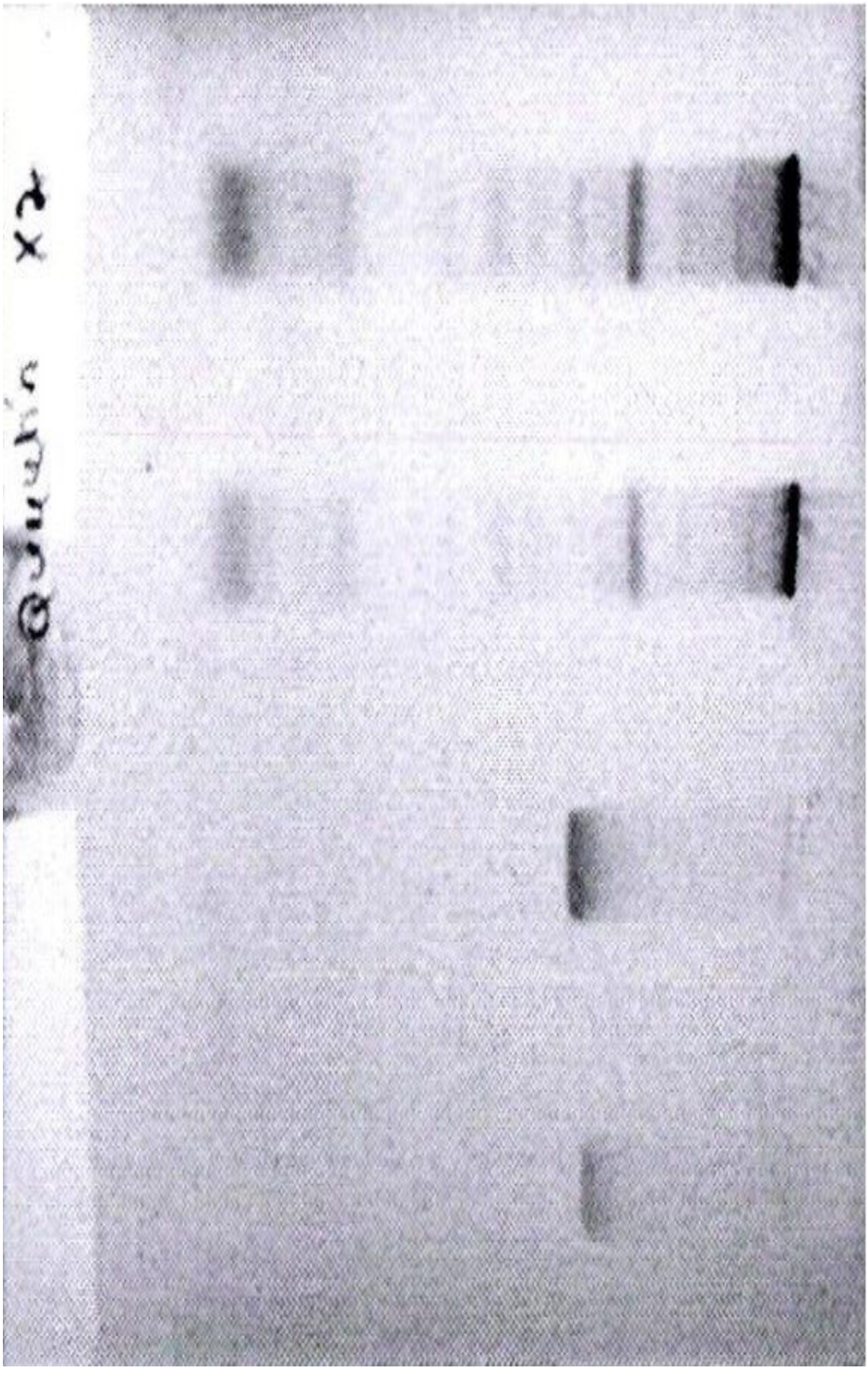


Figura 1. HPTLC fingerprinting plate of quercetin marker compound and ethyl acetate fraction (RAEA) of *Rosa alba* L.

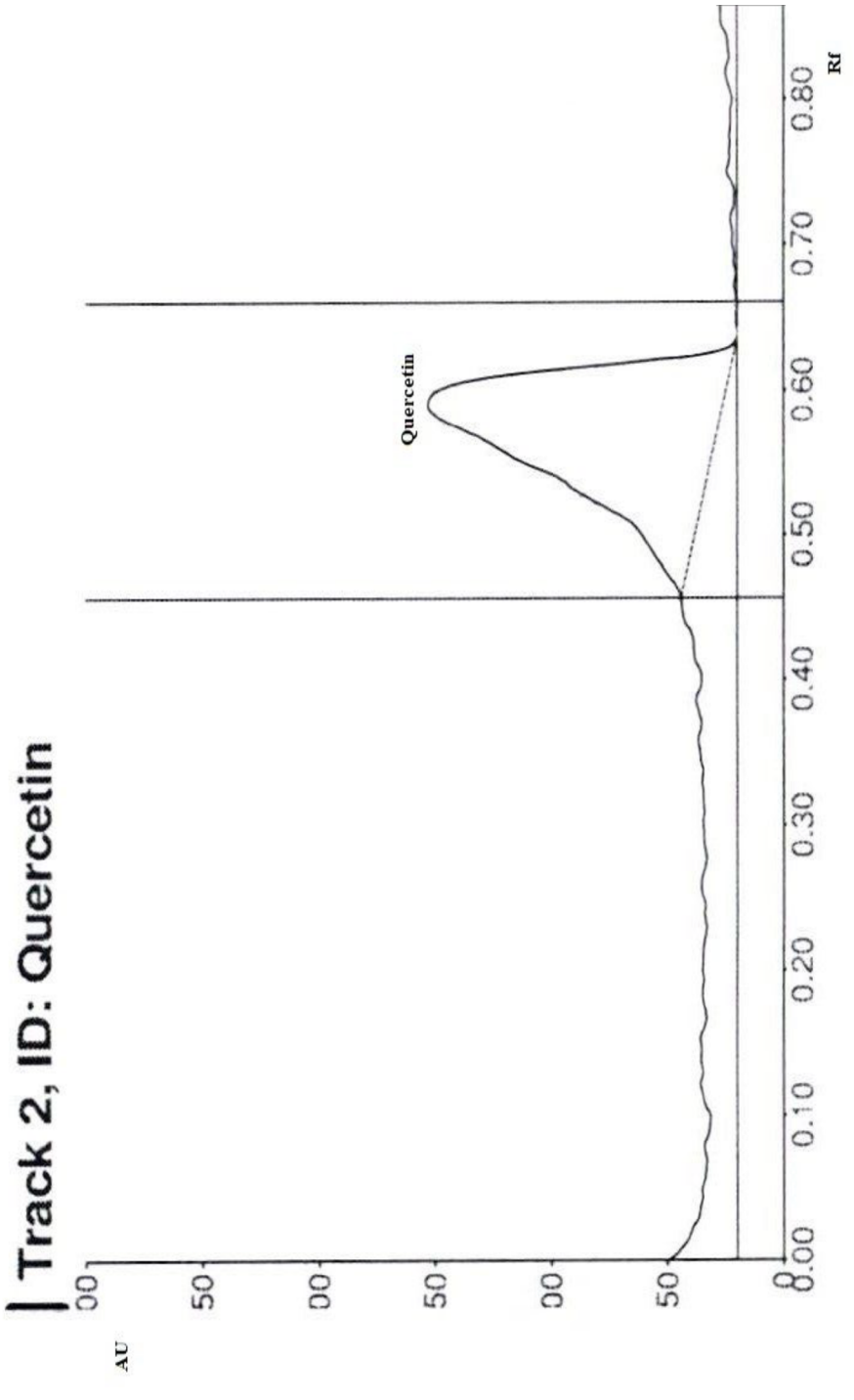


Figura 2. HPTLC densitogram of quercetin marker compound.

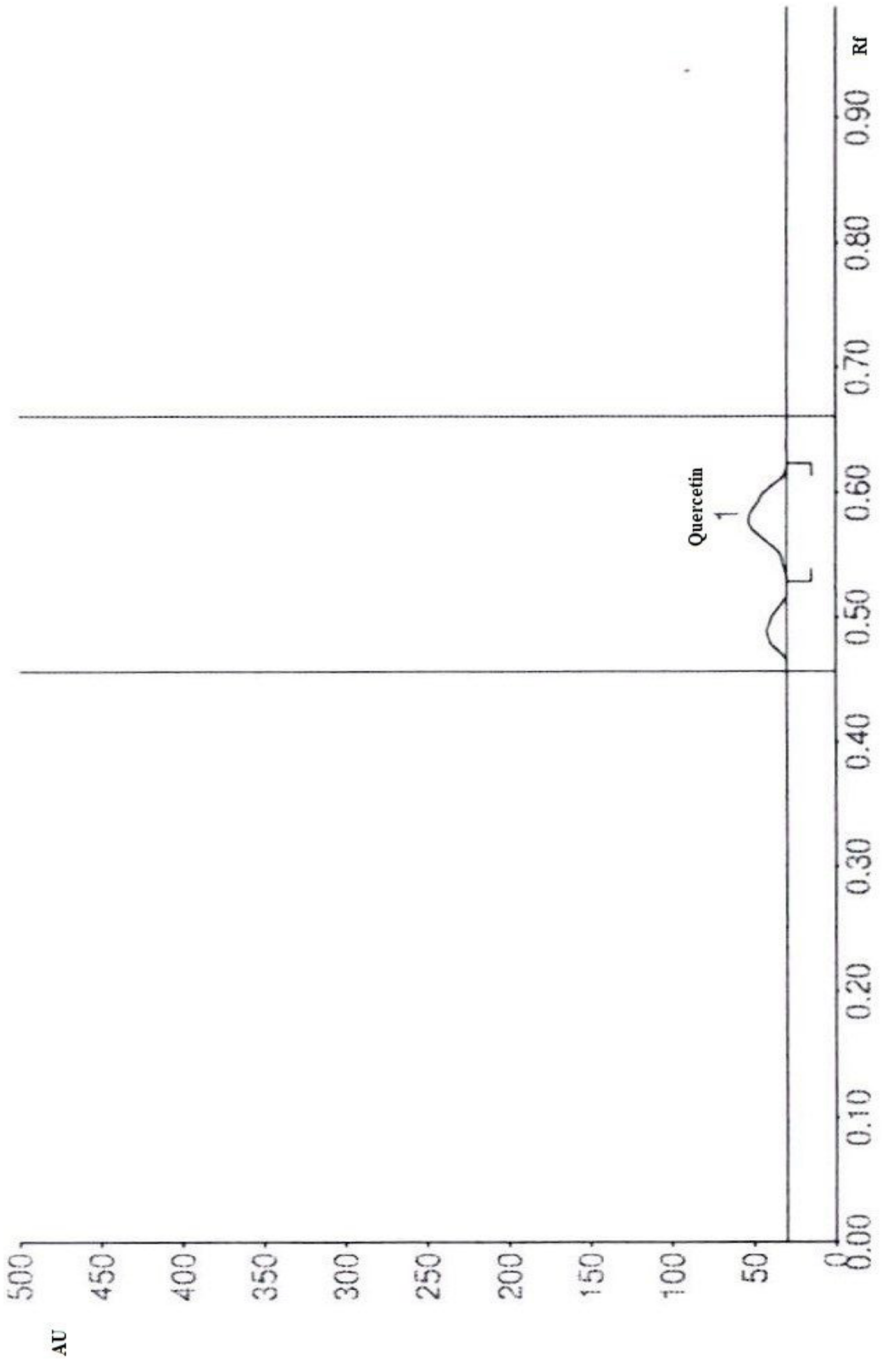


Figura 3. HPTLC densitogram of RAEA.

mobile phase. The HPTLC plate and densitograms were shown in Figures 1 to 3 respectively. The retardation factor (Rf) value of standard quercetin was found to be at 0.58. The amount of quercetin by quantitative HPTLC method was found to be 0.26% w/w.

Effect of RAEE and RAEA on acute arthritic models

On injecting formaldehyde an acute reaction was observed followed by the hyperemic and edematous response in rats, signifying the establishment of acute arthritis. The outcome of joint odema from 0^{th} to 10^{th} day in rats was presented in Fig. 4 after comparison with arthritic control.

Diseased control rats treated with formaldehyde had a significant ($p<0.001$) rise in paw volume and diameter as matched to healthy rats. RAEA at 400mg/kg b.w and aspirin declined paw volume and diameter considerably ($p<0.001$) from day 6 onwards matched to the disease control group. The alteration in paw volume of RAEE was (200 mg/kg; 0.37±0.25; $p<0.05$ and 400 mg/kg; 0.33±0.40; $p<0.01$), RAEA treated groups (200 mg/kg; 0.28±0.43; $p<0.01$ and 400 mg/kg; 0.22±0.53; $p<0.001$) was evident as compared to arthritic control (0.87±0.16; $p<0.001$) (Fig. 4a on day 10).

The variation in paw diameter of RAEE group (200 mg/kg; 3.57±0.77; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 3.31±0.58; $p<0.001$) and for RAEA group (200 mg/kg; 3.23±0.43; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 3.07±0.44; $p<0.001$) was obvious as compared to arthritic control (6.95±0.48; $p<0.001$) (Fig. 4b on day 10).

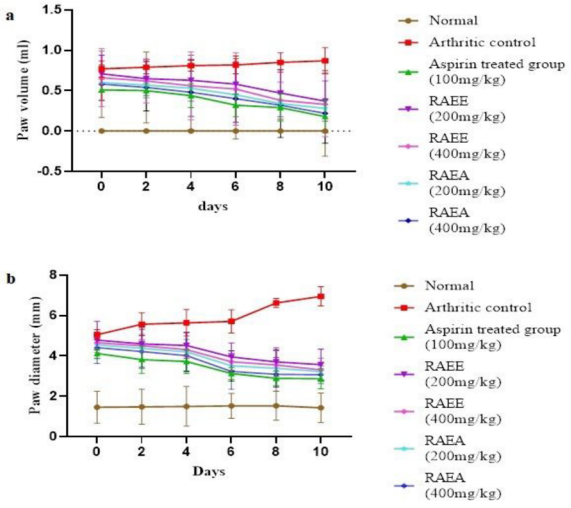


Figura 4. Effects of RAEE and RAEA paw volume and paw diameter in formaldehyde induced arthritic model.

Diseased control rats treated turpentine had a significant ($p<0.001$) rise in paw volume and diameter as matched to healthy rats. RAEE, RAEA and aspirin lessen the distension and diameter from 3 hour onwards as compared to diseased rats as shown in Fig. 5. The alteration in paw volume of RAEE (200 mg/kg; 0.39±0.42; $p<0.01$ and 400 mg/kg; 0.34±0.45; $p<0.001$) and RAEA treated groups (200 mg/kg; 0.31±0.81; $p<0.001$ and 400 mg/kg; $p<0.001$) was noticeable as compared to arthritic control (0.81±0.35; $p<0.001$) on 6 hr in Fig. 5a. The variation in paw diameter of RAEE and RAEA treated groups (200 mg/kg; 4.51±0.48; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 4.31±0.44; $p<0.001$) and (200 mg/kg; 4.19±0.94; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 3.88±0.96; $p<0.001$) respectively was evident as compared to arthritic control (7.89±0.69; $p<0.001$) on 6 hr in Fig. 5b.

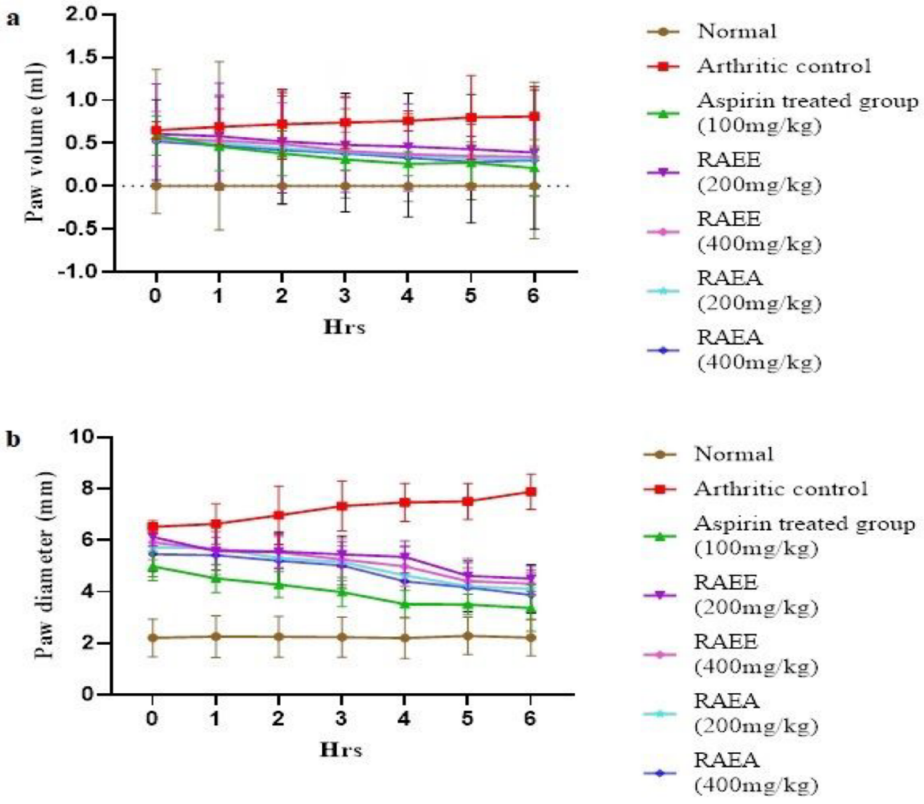


Figura 5. Effects of RAEE and RAEA paw volume and paw diameter in turpentine induced arthritic model.

Effect of RAEE and RAEA in CFA induced arthritic model

Paw swelling

As demonstrated in Fig. 6, rats developed persistent arthritis in their left hind paw. In paw volume, when matched to the positive control, all CFA treated rats had a significant ($p<0.001$) rise in paw volume and diameter. When compared to the arthritic control group, rats given RAEE and RAEA, as well as aspirin, have significant ($p<0.001$) reduced paw volume and diameter by day 16 headlong. The alteration in paw volume of RAEE & RAEA treated groups (200 mg/kg; 0.47±0.89; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 0.38±0.88; $p<0.001$) and (200 mg/kg; 0.30±0.49; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 0.29±0.93; $p<0.001$) respectively was evident as compared to arthritic control (2.01±0.59; $p<0.001$) on day 28 as shown in Fig. 6a.

The variation in paw diameter of RAEE and RAEA treated groups (200 mg/kg; 3.45±1.37; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 3.26±1.66; $p<0.001$) and (200 mg/kg; 3.07±1.87; $p<0.001$ and 400 mg/kg; 2.99±1.20; $p<0.001$) respectively was evident as compared to arthritic control (9.25±1.03; $p<0.001$) on day 28 as shown in Fig. 6b.

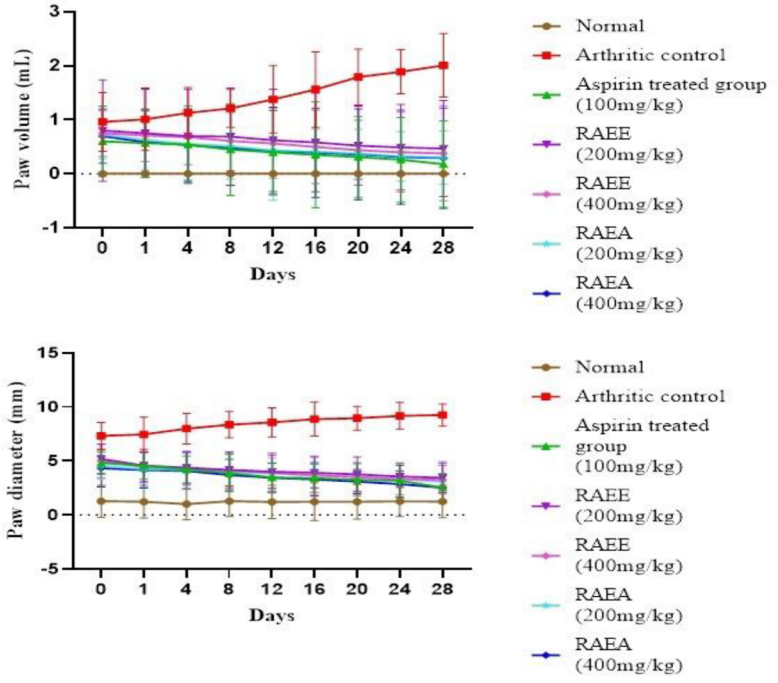


Figura 6. Effects of RAEE and RAEA paw volume and paw diameter in CFA induced arthritic model.

Body weight

This experiment showed that in comparison to the RAEE, RAEA and aspirin-treated groups, the rats in the arthritic control groups lost weight. The body weight of RAEE and RAEA treated groups (200 mg/kg; 175.50±5.89; p<0.001 and 400 mg/kg; 167.83±4.26; p<0.001 and 200 mg/kg; 162.66±5.71; p<0.001 and 400 mg/kg; 155.16±3.48; p<0.001) respectively was obvious as compared to arthritic control group (122.16±3.48; p<0.001) on day 28. Figure 7 showed increased body weight for RAEE and RAEA as compared to the arthritic control group.

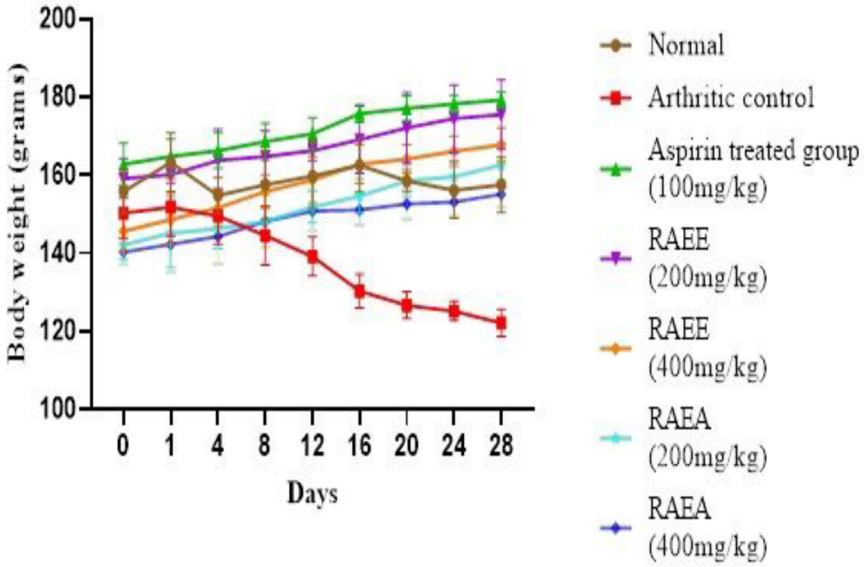


Figura 7. Effect of RAEE and RAEA on body weight in CFA induced arthritic model.

Hematological parameters

The blood samples of all groups were tested for blood factors, 28 days after CFA treatment to rats. White blood cells (WBC) (10.44±1.31-14.22±1.11), Platelet count (4.83±1.35-11.43±1.99), C-reactive proteins (CRP) levels (1.46±0.51-7.54±0.52), and (Rheumatoid factor) RF value (0.00±0.00-53.50±2.88) increased in the CFA treated group, whereas hemoglobin (13.93±1.13-8.38±1.28) and Reb blood cells (RBC) count (7.35±1.86-3.99±1.40) decreased. In the lead with arthritic control group, Group III were observed with diminution WBC as (14.22±1.11-11.41±1.33; p<0.05), platelet count (11.43±1.99-6.66±2.94; p<0.001), CRP levels (7.54±0.52-2.67±1.07; p<0.001), RF value (53.50±2.88-34.50±1.87; p<0.001) but improved Heamoglobin (Hb) value as

(8.38±1.28-13.56±1.35; p<0.001) and RBC value as (3.99±1.40-6.55±1.32; p<0.001). The group experimented with fraction at 400 mg/kg b.w likely to be observed with substantial rise in RBC value as (3.99±1.40-6.95±1.55; p<0.001) and hemoglobin (8.38±1.28-12.55±1.18; p<0.001) but dwindled WBC (14.22±1.11-7.53±1.05; p<0.001), platelet value (11.43±1.99-6.22±1.06; p<0.001), CRP value (7.54±0.52-3.46±0.98; p<0.001) and Rf (53.50±2.88-37.50±1.87; p<0.001) besides with group experimented with fraction at 200 mg/kg b.w in RBC value (3.99±1.40-6.54±1.44; p<0.001), haemoglobin (8.38±1.28-11.35±1.24; p<0.05), WBC (14.22±1.11-8.88±1.39; p<0.001), platelet count (11.43±1.99-7.82±2.25; p<0.01), CRP value (7.54±0.52-4.26±0.96; p<0.001) and RF (53.50±2.88-40.66±1.21; p<0.001). The group experimented with extract at 400 mg/kg b.w. anticipated with less variation in RBC value (3.99±1.40-6.03±1.40; p<0.001), hemoglobin (8.38±1.28-11.38±1.21; p<0.05), WBC (14.22±1.11-9.04±1.37; p<0.001) Platelet count (11.43±1.99-8.78±3.17; p<0.05), CRP value (7.54±0.52-4.43±0.76; p<0.001) and RF (53.50±2.88-43.16±1.16; p<0.001) besides with the group experimented with 200 mg/kg b.w in RBC value (3.99±1.40-5.31±1.30; p<0.05), hemoglobin (8.38±1.28-10.21±1.23; p<0.05), WBC (14.22±1.11– 10.46±1.02; p<0.001), platelet count (11.43±1.99-9.88±2.12; p<0.001), CRP value (7.54±0.52-5.53±0.94; p<0.001) and RF (53.50±2.88-47.16±1.72; p<0.001). The results were depicted in Fig. 8.

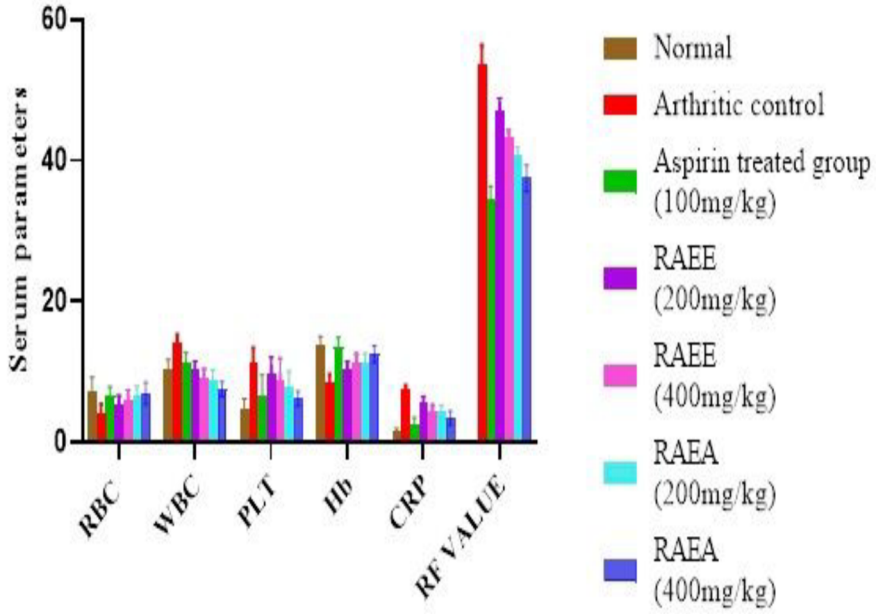


Figura 8. Effect of RAEE and RAEA on hematological parameters in CFA induced arthritic model.

Biochemical parameters

Aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and alanine aminotranferase (ALT) were measured in 28 days following CFA injection in all groups. The CFA-induced rat had substantially higher AST (55.00±2.19-152.00±5.54), ALT (42.97±1.79- 176.33±4.50), and ALP (82.50±5.75-437.78±8.16). The group experimented with aspirin anticipated diminuted levels of serum enzyme marker besides with arthritic control as values to be, AST (152.00±5.54-68.33±4.96; $p<0.001$), ALT (176.33±4.50-54.56±0.53; $p<0.001$), ALP (437.78±8.16-233.16±4.57; $p<0.001$). Upon experimentation with extract at 200 mg/kg b.w. the levels of AST (152.00±5.54-123.16±2.92), ALT (176.33±4.50-91.22±4.78), ALP (437.78±8.16-383±2.36; $p<0.05$) decreases. Experimentation with extract at 400 mg/kg b.w, AST (152.00±5.54-118.33±5.31; $p<0.05$), ALT (176.33±4.50-75.00±3.52; $p< 0.05$), ALP (437.78±8.16-332.33±3.07; $p<0.001$) were also decreases. Noteworthy variations were seen in experimented levels by Group VII, AST (152.00±5.54-85.33±4.13; $p<0.001$) ALT (176.33±4.50-61.28±0.81; $p<0.001$), ALP (437.78±8.16-201.83±1.83; $p<0.001$) as compared with Group VI, AST (152.00±5.54-101.66±5.38; $p<0.01$), ALT (176.33±4.50-71.10±2.64; $p<0.01$), ALP (437.78±8.16-299.66±4.03; $p<0.001$). The results were shown in Fig. 9.

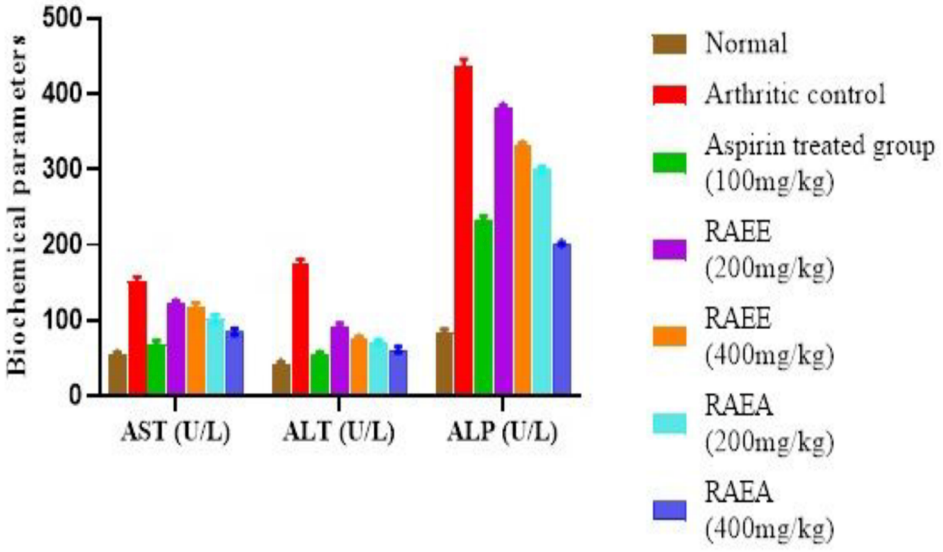


Figura 9. Effect of RAEE and RAEA on biochemical parameters in CFA induced arthritic model.

The effect of RAEE and RAEA on total protein and albumin/globulin (A/G) ratio also significantly ameliorated the value as shown in Fig. 10. For total protein the value for RAEE at 200 mg/kg was (6.45±3.78) and at 400 mg/kg (6.01±2.87) and for RAEA at 200 mg/kg (5.58±1.96) and at 400 mg/kg (4.95±4.23). For A/G ratio the value for RAEE at 200 mg/kg was (1.25±0.88) and at 400 mg/kg (1.34±0.22) and for RAEA at 200 mg/kg (1.39±0.66) and at 400 mg/kg (1.45±0.44).

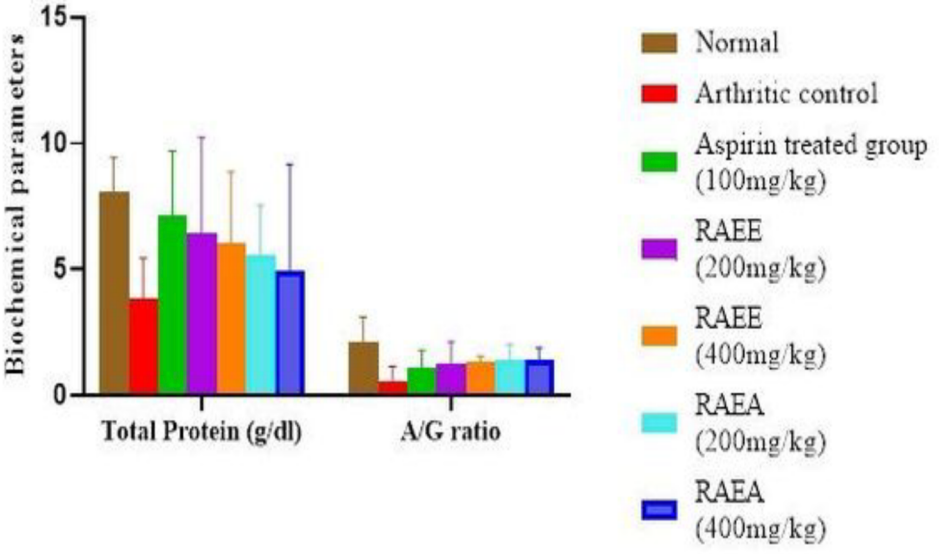


Fig. 10. Effect of RAEE and RAEA on biochemical parameters in CFA induced arthritic model.

Interleukin-6 (IL-6) was also estimated in picogram/ml (pg/ml) and the value for group II was (452.00±35.54; $p<0.001$) which was significantly decreased for RAEA treated group at 400 mg/kg (295.33±49.13; $p<0.001$) as compared to RAEE at 400 mg/kg (328.33±25.31; $p<0.05$). The result was shown in Fig. 11.

Histopathological analysis

In histopathological study, Group I epitomize intact synovial layer, no inflammation and no necrosis of bone, regular synovial cavity (Fig. 12a). In the arthritic control group, deep invasion of inflamed cells, bone necrosis, amplified synovial vascularity, inflated synovial space with filtrates of plasma protein was seen (Fig. 12b). Group III treated rats point up fortification together with necrosis of bone, lessened incursion of inflammatory cells, diminiature synovial vascularity, absence of pannus creation and

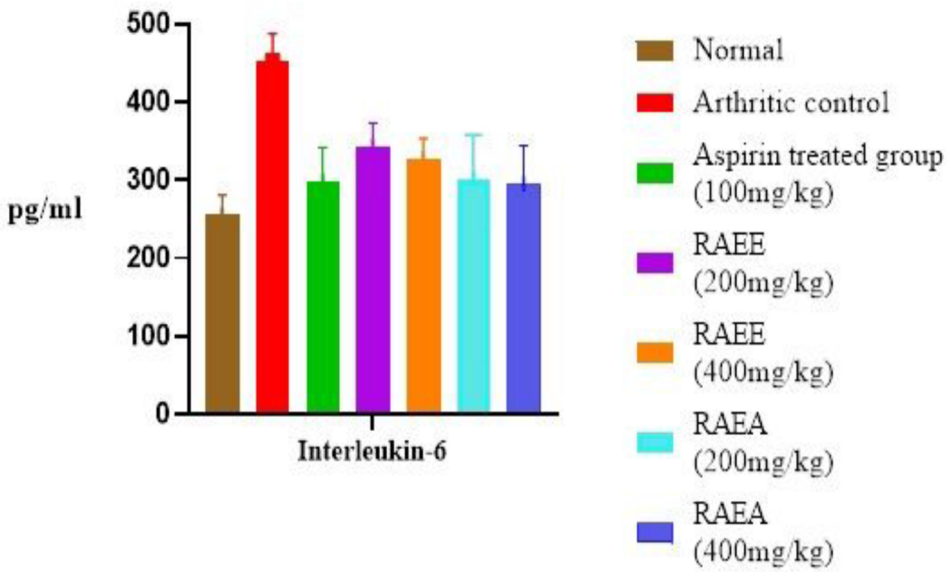


Figura 11. Effect of RAEE and RAEA on biochemical parameters interleukin in CFA induced arthritic model.

fibrin set down as in (Fig. 12c). Group IV exemplify necrosis of bone with inflammatory cells, synovial space, synovial hyperplasia and decreased fibrin deposit as in (Fig. 12d). Group V showed shows necrosis of bone along with inflammatory cells, enlarged synovial gap, synovial hyperplasia and less fibrin deposit as in (Fig. 12e). Group VI showed illustrated reasonable effect with diminished inflammatory cells as in (Fig. 12f). Group VII showed typify worth protection along synovial gap which congealed with reduced fibrin deposit as in (Fig. 12g).

Discussion

The plant *Rosa alba* mostly used in traditional medicine for ameliorating the symptoms associated with rheumatoid arthritis, but there are no scientific studies supporting the claimed use. Hence, the current experiment was accomplished to examine the antiarthritic effect of ethanolic extract and ethyl acetate fraction of the plant in arthritic model. Phytochemical studies and quantitative HPTLC analysis established the existence of diversified phytoconstituents including quercetin in ethyl acetate fraction of the plant (RAEA). The results on acute toxicity studies consider that *Rosa alba* is safe upto the maximum dose including 5000 mg/kg hence two doses were selected

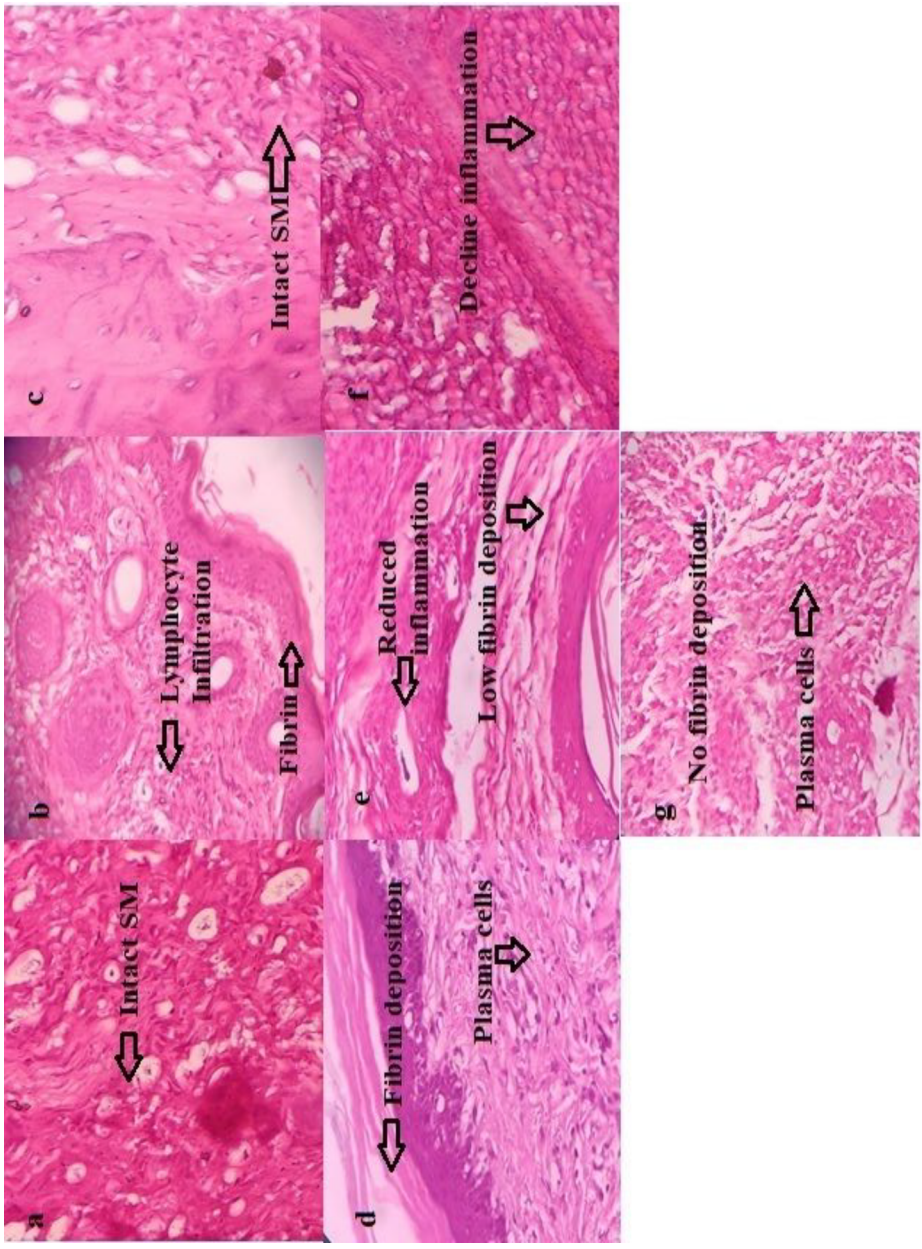


Figura 12. Histopathological analysis of ankle joint stained with haematoxylin-eosin after 28 days.

viz 200 mg/kg b.w and 400 mg/kg b.w for the study. In acute arthritic models the animals were treated orally with the extract and its fractions. Paw swelling were estimated by using formaldehyde and turpentine induced arthritic models. Turpentine induced model has been considered for antiarthritic activity since joint distension was observed due to mediators which includes 5 histamin (5HT), kinins, histamine and prostaglandins [18]. In this study these mediators might have provoked inflammatory reaction which retains for first few hours. Hyperamic and edematous response by formaldehyde is slower and chronic initially which spreads all over the joint [19]. Hence the study includes first and third day induction of arthritis by formaldehyde in the experimental animals. Results of the study justified that ethyl acetate fraction of *R. alba* at 400 mg/kg b.w. were the basis of significant drop in joint swelling in both acute models.

CFA induced arthritic model confirms RA since it resembles human pathophysiology [20] hence considered for this study as the joint pathology seen in adjuvant induced arthritis shows mild cartilage destruction, bone resorption as resemble with human RA. In this study quick, steadfast and easily reckonable polyarthritis was seen after injecting adjuvant first time. Cytokines of both the type 1 T helper cells (Th-1) and T helper 17 cell (Th-17) phenotype were believed as marker in the joint pathology. Amongst the cytokines secreted by Golgi pathway like tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), IL-6, Interleukin-17A (IL-17A), Interleukin-21 (IL-21) and Interleukin-1β (IL-1β), IL-6 has been studied for the exploration of significant levels in chronic state of the disease.

Previous reports see the sights that inflammation, decreased glucose absorption, condensed intake of food and augmented release of TNFα and IL-1 by spleen cells were accountable for reduced body weight [21] hence in this study, there is a decline in the weight of rats in chronic model in arthritic control group. Ito *et al.* (2001) [22] suggests restraining of prostaglandin level and obstruct cyclooxygenase enzyme by aspirin thereby diminishing pain. Excess amount of prostaglandins have an effect on bradykinin or histamine which provokes inflammation. In this study aspirin was considered as standard drug for arthritic pain and swelling. Induction of arthritis by CFA causes mutilation in liver and kidney function and assessed by taking into consideration of larger amount serum enzyme as ALP, ALT and AST in the serum. Arthritis intended to cause discharge of chemotactic agents which pull leukocytes towards itself because of complement fixation. The ALP, ALT and AST levels in serum were augmented by phagocytization of leukocytes which releases phosphatases. Moreover bone type ALP resulting by synovial tissue may be accountable for amplified ALT and AST and ALP levels in serum [23]. In this study CFA induced arthritic model shows increased level of ALP, AST and ALT hence caused inflammation. Report claimed that arthritis is linked with decrease in plasma albumin and increase in plasma globulin on account of amplified permeability of vascular tissues to albumin as production of histamine, brad-

ykinin and prostaglandins causes diminishing level of albumin [24]. In this study high levels of globulin and low levels of albumin in extract and fraction treated group indicates recovery of inflammatory condition. Low A/G ratio indicates overproduction of globulin and less production of albumin which indicates higher amount of total protein in the serum as discussed [25]. High A/G ratio in this study indicates recovery of inflammatory condition in extract and fraction treated groups in dose dependent manner.

In arthritic condition RBC count, WBC count, Hb, platelets, RF and CRP were important tool. As per the previous report [26], illustrates that excess flow of interleukin 6 (IL6), arouses release of hepcidin from liver cells and exerts reticence effect on liberation of iron by macrophages. These events will confiscate supply of iron to erythropoiesis grounds anemia. Rheumatoid factor RF, was taken into account to get the information about immune response and so considers as marker in RA count. Depending upon the severity of rheumatoid arthritis there is an increase in platelet count. In RA thrombopoetin level is increased in acute phase while apart from the thrombopoeitin different cytokines like IL-6, IL-1β, Interleukin-4 (IL-4) were also increased and correlated with the severity of disease which leads to pathologic thrombocytosis. In this study an increase in Hb, RBC count, decrease in RF and restoration of CRP, IL-6 and platelets showed ameliorating inflammatory condition. Augmented levels of neutrophils allied with interleukin increases WBC and acute phase proteins along with CRP in adjuvant arthritis. In this study rise in WBC count was observed in arthritic group but in extract and treated groups WBC count decreases which indicates improvement in the inflammatory condition.

Quercetin exemplifies as an anti-inflammatory and antiarthritic moiety from past many years [27]. In this study the extract and fraction of *R. alba* diminishes the elevated interleukin (IL-6) level suggesting decreased inflammatory reactions at molecular level.

Histopathology of organ signifies the texture of affected organs and tissues related to the disorder. It also justifies the toxic effect of test drugs on rodents. In this study, the tissue infiltration in extract and fraction treated groups decreased hence improvement in the arthritic conditions.This study limits in ascertaining the effect of quercetin in decreasing the manifestations associated with arthritis.

Conclusion

Rosa alba L. has potential antiarthritic effect in the presented experimental work. The possible effects on arthritis could probably be interrelated with the existence of flavonoid present and decrease in the interleukin (IL-6) level in the ethyl acetate fraction

treated animals. Hence this study supports the pharmacological facts to reported traditional claim of the plant in the management of manifestations related to arthritis.

Author contribution

All authors made substantial contributions to the conception and design, acquisition of the data or analysis and interpretation of data; took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; agreed to submit to the current journal; gave final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work. All the authors are eligible to be an author as per the international committee of medical journal editors (ICMJE) requirements/guidelines.

Acknowledgements

Authors acknowledges the contribution of Dr. Arti Garg (Scientist E) Botanical Survey of India, Prayagraj in authentication of plant material. The authors also acknowledge involvement of Dr. Anupama Sharma United Diagnostic Centre, Allahabad for serving practical hands for estimating the serum parameters and histopathology in animal experimentation. The authors also acknowledge United Institute of Pharmacy, Allahabad for animal authentication as per Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals guidelines for providing the animal house facility to carry out in vivo experiments. The authors also acknowledge Arbro laboratories Pvt Ltd, delhi for providing the High performance thin layer chromatography fingerprinting data.

Funding

There is no funding to report.

Conflicts of interests

The authors report no financial or any other conflicts of interest in this work.

Ethical approvals

Animal experiments performed followed the ethical standards for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by the Institutional Ani-

mal Ethical Committee in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" and ARRIVE guidelines.

References

1. Q. Guo, Y. Wang, D. Xu, J. Nossent, N.J. Pavlos, J. Xu, Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies, *Bone Res.*, **6**, 15 (2018).

2. S. Safiri, A.A. Kolahi, D. Hoy, E. Smith, D. Bettampadi, M.A. Mansournia, A. Almasi-Hashiani, A. Ashrafi-Asgarabad, M. Moradi-Lakeh, M. Qorbani, G. Collins, A.D. Woolf, L. March, M. Cross, Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017, *Ann. Rheum. Dis.*, **78**, 1463-1471 (2019).

3. S.A. Tabish, Complementary and Alternative Healthcare: Is it Evidence-based?, *Int. J. Health Sci.* (*Qassim*), **2**, 5-9 (2008).

4. A. Verma, R. Srivastava, P.K. Sonar, R. Yadav, Traditional, phytochemical, and biological aspects of *Rosa alba* L.: A systematic review, *Futur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 114 (2020).

5. A. Georgieva, A. Dobreva, E. Tzvetanova, A. Alexandrova, M. Mileva, Comparative study of phytochemical profiles and antioxidant properties of hydrosols from Bulgarian *Rosa alba* L. and *Rosa damascena* Mill, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, **22**, 1362-1371 (2019).

6. M.M. Mileva, V.K. Kusovski, D.S. Krastev, A.M. Dobreva, A.S. Galabov, Chemical composition, *in vitro* antiradical and antimicrobial activities of Bulgarian *Rosa alba* L. essential oil against some oral pathogens, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3**(7) 11-20 (2014).

7. N. Sethi, D. Nath, R. Singh, R. Srivastava, Antifertility and teratogenic activity of some indigenous medicinal plants in rats, *Fitoterapia*, **61**(1), 64-67 (1990).

8. G. Jovtchev, A. Stankov, A. Georgieva, A. Dobreva, R. Bakalova, I. Aoki, M. Mileva, Cytotoxic and genotoxic potential of Bulgarian *Rosa alba* L. essential oil – *in vitro* model study, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **32**, 513-519 (2018).

9. G. Avneet, S.M. Pal, S.S. Siddhraj, A review on herbal Ayurvedic medicinal plants and its association with memory functions, *J. Phytopharmacol.*, **7**, 162-166 (2018).

10. M. Fukada, E. Kano, M. Miyoshi, R. Komaki, T. Watanabe, Effect of 'rose essential oil' inhalation on stress-induced skin-barrier disruption in rats and humans, *Chem. Senses*, **37**, 347-356 (2012).

11. L. Breton, N. Pineau, *Bradykinin antagonists comprising rosaceae plant extracts*, Patent No. US 6,586,020 B1, 2003.

12. M.M. Mileva, E. Krumova, J. Miteva-Staleva, N. Kostadinova, A. Dobreva, A.S. Galabov, Chemical compounds, in vitro antioxidant and antifungal activities of some plant essential oils belonging to Rosaceae family*, Comptes rendus de l'Acad 'emie bulgare des Sciences*, **67**(10), 1363-1368 (2014).

13. P. Brzezinski, L. Martini, Rosacea treated with rose petals: a calembour that affords intriguing results, *Our Dermatology Online*, **10**, 393-395 (2019).

14. K. Hosni, *Rosa* × *alba:* source of essential minerals and volatile oils, *Nat. Products Bioprospect.*, **1**, 57–61, (2011).

15. K.R. Kirtikar, B.D. Basu, *Indian medicinal plants*, 2nd ed., Edited, Revised, enlarged, and mostly rewritten by E. Blatter, J.F. Caius, and K.S. Mhaskar, Lalit Mohan Basu, Allahābād, India, 1935.

16. J.B. Harbone, Methods of Extraction and Isolation, in *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, London, 1998, pp. 60-66.

17. OECD, *Test no. 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method*, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2002.

18. T. Opriessnig, L.G. Giménez-Lirola, P.G. Halbur, Polymicrobial respiratory disease in pigs, *Anim. Health Res. Rev.*, **12**, 133-148 (2011).

19. A.D. Fischer, A. Adeyemo, M.E. O'Leary, A. Bottaro, Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights, *Arthritis Res. Ther.*, **19**(1), 146 (2017).

20. M. Murakami, T. Hirano, The molecular mechanisms of chronic inflammation development, *Front. Immunol.*, **3**, 323 (2012).

21. S. Ekambaram, S.S. Perumal, V. Subramanian, Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model, *BMC Complement. Altern. Med.*, **10**, 56 (2010).

22. S. Ito, E. Okuda-Ashitaka, T. Minami, Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin, *Neurosci. Res.*, **41**, 299-332 (2001).

23. V. Pallinti, N. Ganesan, M. Anbazhagan, G. Rajasekhar, Serum biochemical markers in rheumatoid arthritis, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **46**, 342-344 (2009).

24. S.F. Libregts, L. Gutiérrez, A.M. de Bruin, F.M. Wensveen, P. Papadopoulos, W. van Ijcken, Z. Ozgür, S. Philipsen, M.A. Nolte, Chronic IFN-γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis, *Blood*, **118**(9), 2578-2588 (2011).

25. W. Ansar, S. Ghosh, *Biology of C reactive protein in health and disease*, 1st ed., Springer, New Delhi, India, 2016.

26. M. Milovanovic, E. Nilsson, P. Järemo, Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis, *Clin. Chim. Acta*, **343**, 237-240 (2004).

27. K. Yuan, Q. Zhu, Q. Lu, H. Jiang, M. Zhu, X. Li, G. Huang, A. Xu, Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities, *J. Nutr. Biochem.*, **84**, 108454 (2020).

How to cite this article

M. Singh, D. Ahmed, H. Pandey, R.D. Yadav, S. Singh, S.B. Mishra, Modulation of IL-6 in ameliorating arthritic conditions in rats by *Rosa alba* L flower extract and fraction, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(1), 250-274 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103423

Case report / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.104237*

Case report of patients with chronic non-communicable diseases in pharmacotherapeutic monitoring remotely during the COVID-19 pandemic

Amanda dos Santos Teles Cardoso, Cinara Vasconcelos da Silva, Marcelo Tavares Pereira, Max Denisson Maurício Viana*

Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Ondina - 40170-115 - Salvador, BA – Brazil. Phone: + 55 (71) 32836973 Fax: +55 (71) 32836900.

*Author for correspondence: max.viana@ufba.br

Received: August 12, 2022

Corrected: October 21, 2022

Accepted: October 28, 2022

Summary

Introduction: due to the COVID-19 pandemic, elective consultations were suspended, some of which were carried out by teleconsultation. In this context, the pharmacist had a lot to contribute through supported self-care, resolution of minor disorders and referral, when necessary, to the appropriate level of health care, according to the patient's health needs and the organization of the health system during the pandemic. To this end, technology works as an ally, as it allowed interaction with the patient, reduces the movement of people and financial expenses in the search for services. **Objective**: to describe two case reports of patients, attended by the University Pharmacy of UFBA, with chronic non-communicable diseases in pharmacotherapeutic monitoring by remote means during the pandemic. **Material and Methods:** in view of the above, this study aimed to describe two successful experiences of pharmaceutical teleconsultation for patients with chronic noncommunicable diseases during the COVID-19 pandemic. **Results**: in both cases, it was possible to verify that the easy access to the pharmaceutical professional, as well as the contact and continuous monitoring of medication users, proved to be fundamental to generate supported self-care, better adherence to pharmacotherapy and self-management of medications and lifestyle habits.

Keywords: Chronic diseases, pharmaceutical services, teleconsultation, COVID-19.

Resumen

Reporte de caso de pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles en seguimiento farmacoterapéutico a distancia durante la pandemia de COVID-19

Introducción: debido a la pandemia del COVID-19, se suspendieron las consultas electivas, algunas de las cuales se realizaban por teleconsulta. En este contexto, el farmacéutico tenía mucho que aportar a través del autocuidado apoyado, la resolución de trastornos menores y la derivación, cuando fuera necesario, al nivel de atención adecuado, de acuerdo con las necesidades de salud del paciente y la organización del sistema de salud durante el pandemia. Para ello, la tecnología funciona como un aliado, ya que permitió la interacción con el paciente, redujo el movimiento de personas y los gastos económicos en la búsqueda de servicios. **Objetivo**: describir dos relatos de casos de pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles, asistidos por la Farmacia Universitaria de la UFBA, en acompañamiento farmacoterapéutico por medio remoto durante la pandemia. **Material y métodos:** por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo describir dos experiencias exitosas de teleconsulta farmacéutica para pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles durante la pandemia de COVID-19. **Resultados:** en ambos casos se pudo constatar que el fácil acceso al profesional farmacéutico, así como el contacto y seguimiento continuo de los usuarios de medicamentos, se mostró fundamental para generar autocuidado apoyado, mejor adherencia a la farmacoterapia y autocontrol, manejo de medicamentos y hábitos de vida.

Palabras clave: Enfermedades crónicas, servicios farmacéuticos, teleconsulta, COVID-19.

Resumo

Relato de caso de pacientes com doenças crônicas não transmissíveis em acompanhamento farmacoterapêutico remoto durante a pandemia da COVID-19

Introdução: devido à pandemia do COVID-19, as consultas eletivas foram suspensas, algumas das quais foram realizadas por teleconsulta. Nesse contexto, o farmacêutico teve muito a contribuir por meio do autocuidado apoiado, resolução de pequenos distúrbios e encaminhamento, quando necessário, para o nível

adequado de atenção à saúde, de acordo com as necessidades de saúde do paciente e a organização do sistema de saúde durante o período de internação. pandemia. Para tanto, a tecnologia funciona como aliada, pois permitiu a interação com o paciente, reduz a movimentação de pessoas e gastos financeiros na busca por serviços. **Objetivo**: descrever dois relatos de casos de pacientes com doenças crônicas não transmissíveis, atendidos pela Farmácia Universitária da UFBA, em acompanhamento farmacoterapêutico por meio remoto durante a pandemia. **Material e métodos:** siante do exposto, este estudo teve como objetivo descrever duas experiências exitosas de teleconsulta farmacêutica para pacientes com doenças crônicas não transmissíveis durante a pandemia de COVID-19. **Resultados:** em ambos os casos, foi possível verificar que o fácil acesso ao profissional farmacêutico, assim como o contato e acompanhamento contínuo dos usuários de medicamentos, mostraram-se fundamentais para gerar o autocuidado apoiado, melhor adesão à farmacoterapia e autocuidado, a gestão de medicamentos e hábitos de vida.

Palavras-chave: Doenças crônicas, serviços farmacêuticos, teleconsulta, COVID-19.

Introduction

On March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the infection by the new coronavirus (SARS-Cov-2) as a pandemic [1]. In this period, several Brazilian locations have adopted measures of social distance as the main effective tool for the reduction of contagion by the disease known as COVID-19 (Decree Government of the State of Bahia N° 19,529/2020; Decree of the Municipality of Salvador No. 32,280/2020) [2, 3]. This unique moment in history has led to changes in the dynamics of services and health care for the population, including pharmaceutical services.

Elective consultations have been suspended or made possible through remote means such as online and telephone calls. In the pharmaceutical field, Collegiate Board Resolution No. 44/2009 provided for the possibility of dispensing medicines remotely (telephone, facsimile and internet) with the guarantee of the right to information and guidance on the use of the requested medicines, through direct and immediate communication with the pharmacist [4].

In 2022, the Federal Council of Pharmacy regulated Resolution No. 727/2022 that provides for the regulation of Telepharmacy in Brazil, understood as the exercise of Clinical Pharmacy mediated by Information and Communication Technology (ICT), remotely, in real time (synchronous) or asynchronous, for purposes of promotion, pro-

tection, monitoring, recovery of health, prevention of illnesses and other health problems, as well as for the resolution of pharmacotherapy problems, for the rational use of medications and other technologies in health [5].

In countries like Pakistan, China and Columbia, pharmacists have worked to offer clinical services from remote environments in non-clinical areas, in health units and pharmacies or in their own homes. The aim was to contribute to social distance and prevent people from leaving, as well as making health information available to those who did not have easy access to medical consultations, such as in poor and developing countries [6].

Pharmacotherapeutic follow-up is a type of pharmaceutical service in which, in the care process, problems and negative results related to medications are identified through the analysis of causes and documented interventions with the objective of solving or preventing them. As its name demonstrates, continuity of care is characteristic of this service, which results in multiple pharmaceutical consultations with a comprehensive view of the patient. For this reason, several other services can be developed in pharmacotherapeutic follow-up, such as health education, review of pharmacotherapy and health screening [7].

This pharmaceutical clinical service has been quite targeted and effective for people with chronic noncommunicable diseases (NCDs), which are the leading cause of death worldwide, accounting for 63% of global deaths [8]. The prevalence of NCDs is associated with an aging population, which, in general, is affected by multimorbidities and, therefore, is polymedicated. Thus, for the control of diseases, a multidisciplinary approach is needed, centered on the patient, in which the pharmaceutical intervention can promote better results with pharmacotherapy and non-drug treatment [9].

In the perspective of the current pandemic of COVID-19, in which the elderly and people with NCDs had been at higher risk, health care had to redouble efforts to control chronic health conditions and the effective social detachment of this population, which can develop serious conditions such as acute respiratory syndrome, pneumonia (viral or due to bacterial complications) and evolution to death [10].

In this context, the pharmacist had a lot to contribute through supported self-care, the resolution of minor disorders and referral, when necessary, to the appropriate level of health care, according to the patient's health needs and the organization of the health system during the pandemic. To this end, technology worked as an ally, as it allowed interaction with the patient and it reduced the movement of people and the financial expenses in the search for services [11].

In view of the above, this study aimed to describe two case reports of patients, attended by the University Pharmacy of UFBA, with chronic non-communicable diseases undergoing pharmacotherapeutic monitoring by remote means and who had minor health disorders during the pandemic.

Material and methods

The design of the study was the case report [12]. The case reports refer to two patients treated remotely by pharmacists from the UFBA University Pharmacy during the COVID-19 pandemic, in the period from March to May 2020, residents of the city of Salvador-BA. These patients had previously been treated during the pandemic and needed to monitor two health problems during the Public Health Emergency. The names used in the work for patients are fictitious.

The consultations were carried out with the WhatsApp® application, via the exchange of text messages, audios and images. The image files contained photos of medications, prescriptions and/or exams, made available to the patient when requested by the pharmacist, depending on the need, for pharmaceutical evaluation.

The message exchanges occurred by spontaneous demand from two patients followed by two questions and answers from pharmacists regarding health complaints, as well as known health problems, for monitoring and control purposes.

The clinical record was based on the SOAP method (Subjective, Objective, Evaluation and Plan). A form (electronic record) was created in Microsoft Office Excel® for the clinical record of appointments. The conversations were deleted after completing the medical record to protect the confidentiality of patient information, according to the General Law for the Protection of Personal Data No. 13,709 of August 14, 2018 [13].

The case discussions were based on clinical and therapeutic aspects, considering symbolic elements related to each patient's medication experience. Drug-Related Problems were classified according to the document "Pharmaceutical Care in Primary Care: notebook 2" [14].

As these are cases involving patients with chronic non-communicable diseases, the self-care tool supported "Stages of Motivation for Change" proposed by Prochaska and Di-Clemente in 1982, a transtheoretical model that describes change, was used in pharmaceutical consultations as a process experienced in different stages of motivation and readiness [15]. The attitudes presented by the patients in relation to the motivation for changes in lifestyles with an impact on their health conditions were classified according to Table 1.

Table 1. Stages of motivation for change (Prochaska and Di-Clemente, 1982)

Stage	Features
PRE-CONTEMPLATION	That's not a problem for me now, I'd rather leave everything as it is.
CONTEMPLATION	I think about changing that, but not now. Maybe in the next 6 months.
PREPARATION	I am determined to change now, no later than 1 month (30 days) and I am planning how to do so.
ACTION	I started to change, I put the plan into action but less than 6 months ago.
MAINTENANCE	I've assumed this change for over 6 months and it's already natural for me to do so.
SLIDE (LAPSE)	I was acting differently, I "slipped" but I intend to resume the plan.
RELAPSE	I gave up, went back to acting pretty much like before and abandoned the plan.

Ethics approval

The research project was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia under number 4.756.998.

Results and discussion

Case 01:

The first story refers to Mrs. Judith, 68 years old, diagnosed with hypertension, osteoporosis and overweight. She lost her brother at the age of 28 due to "a heart attack", her father due to "Alzheimer's" complications and her mother due to the worsening of "Chagas' disease". In relation to her medication experience, she reported at the first consultation not taking the medications regularly, as she thinks it is "abuse" to take them every day. She reported self-medication for pain with orphenadrine associated with dipyrone; loperamide when she experiences diarrhea due to emotional issues; and vitamin supplements. In the first consultation, she presented several drugs, perforated, expired and with pills left in the cards. She is sedentary and on a low fiber diet with fried foods and little salt reduction. Hypertension is decompensated. The blood pressure measured in the last face-to-face consultation was 148x85 mmHg. The medications recently prescribed for chronic conditions were: losartan 50 mg (once in the morning); hydrochlorothiazide 25 mg (once in the morning); acetylsalicylic acid 100 mg (once in the morning); and sodium alendronate 70 mg (once a week). During the pandemic, she came into contact reporting diarrhea, vomiting and weakness for 3 days, possible case of acute infectious diarrhea, due to spoiled food. Anamnesis was

carried out and the patient was instructed to take the medication for chronic use correctly, administer a homemade serum for oral rehydration, drink plenty of fluids and eat properly. The next day, she described improvement, although she still had intestinal cramps, nausea and weakness. She continued to feed on fried foods and was advised to redirect the diet towards the consumption of non-greasy foods until total remission of the symptoms, in addition to maintaining hydration with plenty of water and taking probiotics, starting the treatment. She also reported, non-adherence to pharmacological therapy for chronic conditions because she thought that "too much medicine could harm her" and was instructed to resume the correct use of medicines. At the end of the follow-up, the patient reported an improvement in the symptoms presented related to diarrhea and being correctly taking the medications for continuous use, in addition to better blood pressure control.

The case of Mrs. Judith sparks important discussions. First, from the point of view of self-care, it is noted that its motivational stage for changes in lifestyle can be considered as of pre-contemplation, with a resigned posture - that it gave up the possibility of change and seems buried by the problem (which does not consider the possibility of changing, nor is it concerned with the issue) [15].

Another important aspect is the profile of the patient's medication experience. It can be seen from her narrative that there is difficulty in accepting the need for daily use of medications for hypertension associated with the creation of treatment-related myths. Statements such as believing that it is "an abuse to take all medicines every day" and to stop taking the medicines for thinking "that too much medicine could be harmful" point to a negative experience and possible ignorance or disbelief in the function of the medicines in relation to hypertension.

The symbolic value associated with the drug in this case resulted in the decision to suspend pharmacotherapy on its own and culminated in uncontrolled chronic diseases. In addition, it was observed that several issues induced self-prescription in the patient's life, such as emotional and age-related aspects and resulted in the use of inappropriate medications such as orphenadrine, loperamide and the use of vitamin supplements without criteria. Therefore, the indissociability between autonomy and the level of adherence to pharmacotherapy is notorious, which emphasizes the role of the patient and the role of the health professional as a mediator of self-management of medicines [15, 16].

Additionally, the case reveals the health risk situation that the patient was exposed to due to the inappropriate and disoriented use of medications. Orphenadrine is generally poorly tolerated by the elderly due to its anticholinergic effects, such as sedation and the likelihood of falling and fracturing and because it can aggravate conditions

of chronic constipation, its use should be done in a rational manner according to the Beers Criterion. Equally, the use of loperamide to treat diarrhea of unknown causes is risky due to the possibility of late diagnosis, prolonged infection or worsening of constipation with spurious diarrhea, in addition to precipitating toxic megacolon in inflammatory bowel disease [17, 18].

The pharmaceutical interventions in the case presented were aimed at advising the patient about treatments in general, about non-pharmacological measures and about the health condition that was the reason for the teleconsultation, moderate acute food diarrhea, which also involved the indication of a medication for a limited time (the repository of gut microbiota). Moderate acute food diarrhea can be considered a minor, self-limited disorder when properly managed. The diagnostic suspicion was based on the clinical history described by the patient and the monitoring, carried out daily, allowed the identification of warning signs for medical referral and verification of the disease prognosis. As the patient's condition was improving and without the presence of severe abdominal pain, fever and signs of dehydration, it was possible to continue with supported self-care, guiding rehydration to avoid changes in electrolytes, adequate food consumption and the use of probiotics to assist in the recovery of the damaged intestinal wall [19].

Case 02:

The second case concerns to Marcia, 61 years old, with diagnosis of arterial hypertension, osteoporosis and gastric disorders. She had hemorrhoid surgery when she was young and reports constipation. She sought pharmacist by teleconsultation reporting discomfort on the right side of the heart after taking calcium carbonate with vitamin D after lunch, daily, for 15 days. When asked about the use of medications, the patient reported that she only used "omeprazole" (pantoprazole 40 mg) when she ingested sodium alendronate 70 mg weekly. Monthly, she used injectable anti-inflammatories for back pain, prescribed by a rheumatologist. She reported that stopped using medicines for hypertension (losartan 50 mg 12/12 hours and hydrochlorothiazide 25 mg), 15 days ago, because she believed that the pressure was too low, due to consume some vegetables that lower the pressure and interpreted that, when blood pressure was normal, it would not be necessary to use antihypertensive drugs after watching a doctor's interview on tv. She measured her blood pressure with her sister's device and was at 170x100 mmHg. It was noted that she used a brand of calcium carbonate indicated by the clerk with a dose lower than that prescribed by the doctor (calcium carbonate 450 mg + vitamin D 400 IU) and which contained an additionally vitamin K. The patient received pharmaceutical guidance on the importance of drug treatment for NCDs, non-pharmacological measures, receiving a table for organizing the use of

drugs, as well as information on access to drugs prescribed by SUS. After the intervention, Marcia informed that she will undergo tests requested by the doctor and declared that she has been using the medications correctly.

Marcia, from the point of view of self-care, was in the phase of contemplation, characterized by the awareness that there is a problem, however, she presented difficulties for the action of change [15]. In this case, the symbolic value of medicines for the treatment of NCDs is noted again, as their meaning is linked to the production of what it represents, health [20]. The symbolic is related to the efficacy of the medication, which was effective beyond what was expected and was, therefore, unnecessary, causing low adherence to hypertension pharmacotherapy.

The lack of adherence to antihypertensive therapy uncontrolled hypertension and may have caused the symptoms of the main complaint, which the patient associated with calcium carbonate.

The case presented PRM classified as administration and patient adherence to treatment, dispensing error and ineffective treatment with an identified cause. The lack of knowledge about issues of access to medicines by the SUS resulted in the taking of inappropriate medication influenced by the practice of "pushing therapy", as well as unnecessarily burdening the patient. The practice of advertising drugs to convince consumers at the pharmacy counter benefits the pharmaceutical industry, but has numerous negative impacts on consumer health, such as self-medication and the use of the wrong medication [21, 22].

Another medication administration error was related to the use of the proton pump inhibitor, because it was prescribed omeprazole, but she used pantoprazole and the way to use it, which should be continuous, however, she just used it on the day of taking alendronate sodium. The use of proton pump inhibitors with bisphosphonates is common due to gastric irritation that the latter can cause. Postural measures are also recommended to avoid gastrointestinal irritation when using these drugs. However, proton pump inhibitors are more effective with continued use, because their mechanism of action in which the active form binds covalently to sulfhydryl groups of the proton pump cysteines and irreversibly inactivates molecule, taking two to five days for 70% of pump inhibition [23].

The pharmaceutical interventions performed were advising the patient on her drug treatment and non-pharmacological measures, as well as information on access to medications and referral to the attending physician's return after carrying out the requested tests, postponed due to the pandemic.

In both cases, the fact that they are at risk for COVID-19 has generated fear in the demand for health services by patients and has boosted the search for pharmaceutical guidance, pointing out the importance of the bond previously between the pharmacist and the patient and of technology as a tool for health promotion. In the midst of the pandemic, telehealth has proved to be an innovative solution for the provision of health services, adding benefits such as reduced service time, flexibility and easy access to health professionals and savings with travel costs for professionals and patients [11]. The cases presented demonstrated that it is possible to carry out pharmaceutical guidelines through widely accessible messaging applications, avoiding self-medication and motivating the correct use of medicines for NCDs.

Conclusion

In Brazil, although quality internet access is uneven, people often use messaging applications and this work has demonstrated that it is possible to carry out pharmacotherapeutic monitoring remotely with this tool, balancing the limitations and possibilities inferred from the process. In both cases, it was possible to verify that the easy access to the pharmaceutical professional, as well as the contact and continuous monitoring of medication users, proved to be fundamental to generate supported self-care, better adherence to pharmacotherapy and self-management of medications and lifestyle habits, to improve the quality of life of the patient with chronic conditions.

Disclosure statement

All authors report that they do not have any conflicts of interest.

References

1. agência Brasil. Empresa Brasileira de Comunicação (EBC), Organização Mundial de Saúde declara pandemia do novo coronavírus. URL: https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2020-03/organizacao-mundial-da-saude-declara-pandemia-de-coronavirus. Accessed on July 20, 2021.

2. Bahia, Casa Civil, Decreto nº 19.529 de 16 de março de 2020 que regulamenta, no Estado da Bahia, as medidas temporárias para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus.

3. Salvador, Prefeitura de Salvador, Decreto nº 32.280 de 23 de março de 2020 que define medidas complementares para o enfrentamento da pandemia decorrente do coronavírus.

4. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 44, de 17 de agosto de 2009, que dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias e dá outras providências.

5. Brasil, Conselho Federal de Farmácia, Resolução nº 727, de 30 de junho de 2022 que dispõe sobre a regulamentação da Telefarmácia.

6. N. Bukhari, H. Rasheed, B. Nayyer, Z. Babar, Pharmacists at the frontline beating the COVID-19 pandemic, *J. Pharm. Policy Pract*., **13**, 8 (2020).

7. Brasil, Conselho Federal de Farmácia, Serviços farmacêuticos diretamente destinados ao paciente, à família e à comunidade: contextualização e arcabouço conceitual, Brasília, 2016.

8. D.C. Malta, S.S. Andrade, T.P. Oliveira, L. Moura, R.R. Prado, M.F. Souza, Probability of premature death for chronic non-communicable diseases, Brazil and Regions, projections to 2025, *Rev. Bras. Epidemiol.*, **22**, e1900302019 (2019).

9. E.V. Mendes, *As redes de atenção à saúde*, 2a ed., Conselho Nacional de Secretários de Saúde (Conass), Brasília, 2011.

10. Brasil, Ministério da Saúde, *Protocolo de manejo clínico do coronavírus* (*Covid-19*) *na Atenção Primária à Saúde*, Brasília, 2020.

11. R. Caetano, A.B. Silva, A.C. Guedes, C.C. Paiva, G.R. Ribeiro, D.L. Santos, R.M. Silva, Challenges and opportunities for telehealth during the COVID-19 pandemic: ideas on spaces and initiatives in the Brazilian context, *Cad. Saúde Pública*, **36**(5), e00088920 (2020).

12. A.C. Gil, *Estudo de caso*, Atlas, São Paulo, 2009.

13. Brasil, Lei nº 13.709 de 14 de agosto de 2018, Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD), Palácio do Planalto, Brasília, 2018.

14. Brasil, Ministério da Saúde, *Cuidado farmacêutico na atenção básica - Caderno 2: Capacitação para implantação dos serviços de clínica farmacêutica*, Brasília, 2014.

15. A.M. Cavalcanti, A.C. Oliveira, *Autocuidado Apoiado: Manual do Profissional de Saúde*, Secretaria Municipal de Saúde, Curitiba, 2012.

16. J.G. Freitas, S.E. Nielson, C.C. Porto, Adesão ao tratamento farmacológico em idosos hipertensos: uma revisão integrativa da literatura, *Rev. Soc. Bras. Clin. Med*., **13**(1), 75-84 (2015).

17. American Geriatrics Society Beers Criteria Update Expert Panel, American Geriatrics Society updated AGS Beers Criteria for potentially inappropriate medication use in older adults, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **67**(4), 674-694 (2019).

18. M.G. Oliveira, W.W. Amorim, C.R.B. Oliveira, H. L. Coqueiro, L.C. Gusmão, L.C. Passos, Consenso brasileiro de medicamentos potencialmente inapropriados para idosos, *Geriatr. Gerontol. Aging*, **10**(4), 168-181 (2016).

19. L.A. Marques, *Atenção farmacêutica em distúrbios menores*, 2a ed., Livraria e Editora Medfarma, São Paulo, 2008.

20. J.R. Junges, T. Bagatini, Construção de sentido nas narrativas de doentes crônicos, *Rev. Assoc. Med. Bras*., **56**(2), 179-185 (2010).

21. M.C. Nascimento, Medicamentos, comunicação e cultura, *Ciênc. Saúde Coletiva*, **10**(Suppl), 179-193 (2005).

22. D.O. Melo, E. Ribeiro, S. Storpirtis, A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos, *Rev. Bras. Cienc. Farm*., **42**(4), 475-485 (2006).

23. L.L. Brunton, B.A. Chabner, B.C. Knollmann, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*, McGraw-Hill Medical, New York, 2012.

How to cite this article

a.d.S. Teles-Cardoso, C. Vasconcelos da Silva, M. Tavares-Pereira, M.D.M. Viana, Case report of patients with chronic non-communicable diseases in pharmacotherapeutic monitoring remotely during the COVID-19 pandemic, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*., **52**(1), 275-286 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.104237

Artículo de revisión / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101736*

Sedación oral a nivel pediátrico aplicada en odontología

Guido José Jiménez Terreros[1a], María Cristina Alvear-Córdova[1b], María Isabel Astudillo Crespo[1c], Edisson Mauricio Pacheco-Quito [1,2d*]

[1] Unidad Académica de Salud y Bienestar, Carrera de Odontología, Universidad Católica de Cuenca, 010105 Cuenca, Ecuador.

[2] Grupo de investigación: Innovación y Desarrollo Farmacéutico en Odontología, Jefatura de Investigación e Innovación, Universidad Católica de Cuenca, 010105 Cuenca, Ecuador.

Correos electrónicos:

[a] gjjimenezt00@est.ucacue.edu.ec

[b] malvearc@ucacue.edu.ec

[c] isaastudillo@hotmail.com

*Autor para la correspondencia: [d] epachecoq@ucacue.edu.ec

Recibido: 22 de marzo de 2022

Revisado: 21 de noviembre de 2022

Aceptado: 28 de noviembre de 2022

Resumen

Introducción: los procedimientos dentales invasivos con su aluvión de instrumentación, olores, sonidos, a menudo se consideran como uno de los eventos que más ansiedad y producen en la sociedad. El comportamiento de los niños en el entorno dental frecuentemente es complicado, sin embargo, la mayoría de los infantes se suelen tratar fácilmente con técnicas de orientación conductual y apoyo de los padres, no obstante, en algunos casos requieren de manejo farmacológico para soportar los tratamientos dentales invasivos. El tratamiento farmacológico en estos casos va desde la ansiolisis leve hasta la anestesia general. Dado que la sedación segura requiere de una formación adecuada del odontólogo, esta revisión pretende describir la sedación oral y su aplicación en niños a nivel dental. **Metodología:** esta investigación se basa en una revisión bibliografía exhaustiva, con búsqueda y análisis de infomación en base al tema planteado a través de bases de datos como PubMed, Scopus, SciELO y Google scholar. **Resultados y discusión:** la Asociación Dental Americana proporciona definiciones precisas para cada nivel de sedación y anestesia, en base a estas enstandarizaciones los organismos estatales dentales han desarrollado reglas y regu-

laciones para la sedación pediátrica en odontología, por la misma que está influenciadas por las demandas de la sociedad, las agencias reguladoras, las directrices internacionales, las implicaciones financieras y la formación profesional. **Conclusiones:** la sedación dental pediátrica es una herramienta de gran utilidad que puede ser utilizada con éxito en manos de un profesional especializado y con una normativa clara y específica que evite los posibles efectos adversos en los pacientes.

Palabras clave: Sedación, odontopediatría, paciente pediátrico, odontología.

Summary

Pediatric oral sedation applied in dentistry

Introduction: Invasive dental procedures with their barrage of instrumentation, smells, sounds, and are often considered to be one of the most anxiety producing events in society. The behavior of children in the dental environment is often complicated, however, most children are easily treated with behavioral counseling techniques and parental support, however, in some cases require pharmacological management to withstand invasive dental treatments. Pharmacologic treatment in these cases ranges from mild anxiolysis to general anesthesia. Since safe sedation requires adequate training of the dentist, this review aims to describe oral sedation and its application in children at the dental level. **Methodology:** this research is based on an exhaustive review of the literature, with a search and analysis of information based on the topic in question through databases such as PubMed, Scopus, SciELO and Google scholar. **Results and discussion:** the American Dental Association provides precise definitions for each level of sedation and anesthesia, based on these standardizations, state dental organizations have developed rules and regulations for pediatric sedation in dentistry, which is influenced by the demands of society, regulatory agencies, international guidelines, financial implications, and professional training. **Conclusions:** pediatric dental sedation is a very useful tool that can be used successfully in the hands of a specialized professional and with a clear and specific regulation that avoids possible adverse effects on patients.

Keywords: Sedation, pediatric dentistry, pediatric patient, dentistry.

Resumo

Sedação oral no nível pediátrico aplicado em odontologia

Introdução: procedimentos odontológicos invasivos com sua enxurrada de instrumentação, odores, sons e são frequentemente considerados um dos eventos que produzem a maior ansiedade da sociedade. O comportamento das crianças no ambiente odontológico é frequentemente complicado; no entanto, na maioria das crianças, elas geralmente são tratadas com técnicas de orientação e suporte comportamentais, no entanto, em alguns casos, exigem o gerenciamento farmacológico para apoiar os tratamentos odontológicos invasivos. O tratamento farmacológico nesses casos passa de ansiolise leve à anestesia geral. Como a sedação segura requer formação adequada do dentista, esta revisão visa descrever a sedação oral e sua aplicação em crianças no nível odontológico. **Metodologia:** esta pesquisa é baseada em uma revisão exaustiva da bibliografia, com análise de busca e infomming com base no tópico levantado através de bancos de dados como PubMed, Scopus, SciELO e Google Scholar. **Resultados e discussão:** a *American Dental Association* fornece definições precisas para cada nível de sedação e anestesia, com base nesses testes, as organizações estatais odontológicas desenvolveram regras e regulamentos para sedação pediátrica em odontologia, o mesmo que é influenciado pelas demandas da empresa, Agências regulatórias, diretrizes internacionais, implicações financeiras e treinamento profissional. **Conclusões:** a sedação dentária pediátrica é uma ferramenta muito útil que pode ser usada com sucesso nas mãos de um profissional especializado e claro e específico que evitam possíveis efeitos adversos nos pacientes.

Palavras-chave: sedação, dentista pediátrica, paciente pediátrico, odontologia.

Introducción

Las pautas para la sedación de pacientes pediátricos aparecieron a principios de la década de 1980, existen muchas guías de sedación asociadas específicamente para su empleo por parte del anestesiólogo, la única directriz que se ha publicado para pacientes pediátricos a nivel dental, es la guía patrocinada por la Academia Estadounidense de Odontología Pediátrica (AAPD) y la Academia Estadounidense de Pediatría (AAP), que engloba las directrices para la monitorización y el tratamiento de pacientes pediátricos, antes, durante y después de la sedación en procedimientos diagnósticos y terapéuticos [1-4].

Está claro que en la sociedad actual los procedimientos dentales se consideran como eventos que desencadenan mayor grado de ansiedad en un paciente infantil, es bien manifiesto que la odontología implica un aluvión de eventos que engloban instrumentación, olores, sonidos y una reputación asociada por los padres y el niño con el miedo. La gran parte de los pacientes pediátricos que acuden a consulta pueden ser persuadidos con un manejo conductual y el apoyo de los padres, sin embargo, un porcentaje de niños probablemente subestimado entre el 20 al 30%, no coopera en los escenarios dentales de rutina por diferentes factores que influyen en la dinámica de comportamiento, y requieren el uso de sedación para acciones dentales invasivas. Estos pacientes necesitan enfoques avanzados de manejo que incluyen intervenciones farmacológicas que van desde ansiólisis leve hasta anestesia general en quirófano. La sedación segura requiere la formación adecuada del proveedor de atención infantil, en base a la adherencia y aplicación de pautas clínicas específicas. Desafortunadamente se presentan pocas oportunidades durante la formación odontológica de pregrado para abordar de manera competente las técnicas de sedación. En consecuencia, para muchos odontólogos generales los procedimientos de sedación que involucran niños, se convierten en un proceso aprendido empíricamente, lo cual podría estar asociado a un riesgo de resultados peligrosos. Los programas de formación avanzada en odontología pediátrica y maxilofacial brindan experiencias con sedantes orales; sin embargo, aún existe una variabilidad bastante amplia en su uso, es así que los agentes sedantes para procedimientos dentales pueden administrarse por varias vías de administración (oral, inhalatoria, submucosa, intramuscular, intravenosa e intranasal), cada una de las cuales incluye beneficios y riesgos. No obstante, las vías oral e inhalatoria siguen reinando sobre otras vías en popularidad a nivel de odontopediatría [2, 3].

La seguridad del paciente se convierte en el desafío más importante cuando se emplea más de un sedante oral o se producen múltiples administraciones de un sedante en un solo procedimiento, como es lógico y esperable las tasas de fracaso pueden variar considerablemente. Técnicas comunicativas y de distracción por parte del odontopediatra talentoso se vuelven útiles antes de estos procedimientos. La vía de sedación intravenosa tiene una tasa de éxito mayor y constante, frente a otras vías de administración, sin embargo, múltiples desafíos con esta ruta farmacológica, limitan su empleo en pacientes pediátricos ya sea por el miedo natural a las agujas, o porque la propia técnica amerita entrenamiento alto por parte del clínico [2].

Niveles más profundos de sedación causan mayor probabilidad de efectos adversos, y es importante destacar que esto implica que tanto el odontólogo general como el especialista en odontología pediátrica ostente conocimiento profundo y aplicación cuidadosa de maniobras específicas para rescatar al infante de situaciones importantes, que en la mayor parte de los casos comprometen las vías respiratorias, con laringoespasmo y depresión respiratoria respectivamente. Profesionales debidamente capacitados

podrían anticipar, manejar y participar activamente en eventos adversos que ameriten rescate, sin embargo, aquellos que no estén preparados para un evento potencialmente mortal probablemente se verán afectados de manera legal, financiera y emocional.

Un análisis científico de los procedimientos dentales más invasivos realizados en niños, que incluyen cuidado y atención específica para su uso, involucran el empleo de anestesia local, la cual es necesaria incluso durante la mayoría de los procedimientos bajo sedación, y dependiendo de la profundidad de la sedación y la capacidad de manejo del equipo dental para mantener la jeringa y la aguja hipodérmica fuera de la vista del paciente, este proceso tiene gran probabilidad de provocar conductas disruptivas a pesar de un sedante farmacológico. Los diques de goma también son otro procedimiento temido por los niños debido a su miedo natural a la asfixia, no obstante es el mejor medio para proteger las vías respiratorias de líquidos, objetos extraños y vapores de partículas generados durante la preparación dentaria. La colocación de la abrazadera de la grapa en la región apical podría incidir en la unión cemento-esmalte, causando molestias incluso bajo anestesia general. Un procedimiento dental temido por niños e incluso adultos es el ruido y vibraciones producidas por la pieza de mano, lo que provoca disonancia, irritación y miedo en el infante. El clínico debe recordar la importancia de emplear herramientas de orientación conductual con niveles de sedación leves y moderados, adicionalmente es prudente esperar que la tasa de resultados satisfactorios no sea excepcional utilizando la vía oral de administración. Es decir, no se puede crear dependencia exclusiva de drogas para controlar por el comportamiento de un niño, un odontólogo competente que utiliza un arsenal bien perfeccionado de habilidades comunicativas de orientación conductual, procesos de selección de pacientes astutos y sedación terapéutica adecuada ofrecerá un enfoque integral de atención [2-4]. La farmacología de los agentes sedantes, seguida de sus aplicaciones clínicas en el entorno dental, así como sus posibles efectos adversos son la base de esta búsqueda científica orientada con el objetivo de enfrentar con conocimiento cauteloso el proceso de sedar a un niño durante un procedimiento dental.

Metodología

Se realizó una búsqueda exhaustiva de bibliografía encaminada a una investigación documental, mediante técnicas observacionales de temporalidad retrospectiva y actual. Las bases de datos utilizadas fueron: PubMed, Scopus, SciELO y Google Scholar, con la finalidad de adquirir información relevante y actualizada del tema tanto de artículos científicos y como de libros. Se utilizaron descriptores en el idioma español e inglés tales como: "sedación consciente", "hipnóticos y sedantes en odontología", "sedación en niños"; términos que fueron evaluados en DeCS BIREME. Se seleccionaron un total

de 35 artículos de relevancia científica, los cuales pasaron por un proceso de selección de acuerdo con su fecha de publicación e importancia con el tema planteado. Los criterios de exclusión se utilizaron específicamente con la información desactualizada e irrelevante con la temática a tratar.

Resultados y discusión

Niveles de sedación y características

Las guías establecidas por la Asociación Dental Americana (ADA), proporcionan definiciones precisas para cada nivel de sedación y anestesia, en base a estas estandarizaciones, los organismos estatales dentales a nivel internacional han desarrollado reglas y regulaciones que gobiernan el uso de sedación y anestesia para proveedores de salud bucal. Los niveles de sedación pueden ser distinguidos en base a las siguientes especificaciones [5-7].

Sedación mínima: nivel de conciencia mínimamente deprimido por un agente farmacológico, se conserva la capacidad del paciente para mantener de forma independiente la vía aérea, responder a la estimulación táctil y al comando verbal, a pesar que la función cognitiva y la coordinación pueden verse moderadamente afectadas.

Sedación moderada: depresión de la conciencia inducida por fármacos, los pacientes responden intencionadamente a órdenes verbales, ya sea solos o acompañados de una ligera estimulación táctil. No se requieren intervenciones para mantener una vía aérea permeable y la ventilación espontánea es adecuada, manteniéndose la función cardiovascular.

Sedación profunda: depresión de la conciencia inducida por fármacos, los pacientes no pueden despertarse fácilmente, pero responden intencionadamente después de una estimulación repetida o dolorosa. La capacidad para mantener de forma independiente la función ventilatoria puede verse afectada y la ventilación espontánea puede ser inadecuada. Por lo general, se mantiene la función cardiovascular.

Anestesia general: pérdida del conocimiento inducida por fármacos durante la cual los pacientes no se despiertan, ni siquiera por estimulación dolorosa, a menudo requieren asistencia para mantener una vía aérea permeable y puede ser necesaria la ventilación con presión positiva debido a la depresión de la ventilación espontánea o a la depresión de la función neuromuscular inducida por fármacos; la función cardiovascular puede verse afectada.

Clasificación del estado físico preoperatorio

La Sociedad Estadounidense de Anestesiología ha desarrollado un sistema ampliamente utilizado para categorizar el estado físico preoperatorio del paciente, denominado el sistema de clasificación ASA, útil para ayudar a determinar la idoneidad de un paciente pediátrico antes de recibir sedación en el consultorio odontológico. Los niños clasificados como ASA 1 (paciente sano) y ASA 2 (enfermedad sistémica leve, sin limitación funcional) son generalmente candidatos aceptables para el tratamiento en el consultorio dental. Pacientes clasificados como ASA 3 (enfermedad sistémica grave, limitación funcional definida) estables y bien controlados pueden ser tratados en el consultorio siempre que los procedimientos planificados sean de corta duración y el nivel de sedación seleccionada sea ansiólisis o sedación mínima. Pacientes ASA 3 inestables o que requieren procedimientos odontológicos largos e invasivos se tratan mejor en un entorno hospitalario bajo anestesia general. Los niños clasificados como ASA 4 (enfermedad sistémica grave que amenaza la vida) deben recibir atención en un entorno estrictamente hospitalario y bajo hospitalización [8].

Protocolo de cita de sedación dental infantil

Los desafíos de sedar a un niño durante procedimientos dentales son multifactoriales: la edad, la salud, el temperamento y el estado emocional del paciente, así como los estilos e inquietudes de los padres, la filosofía del clínico sobre el manejo del paciente, el alcance y la calidad de la capacitación y las experiencias del odontólogo con la sedación, incluido el rescate, la regulación dental-legal de la sedación, cuestiones financieras, el conocimiento , la adherencia a las pautas de sedación y las actualizaciones, son solo algunas de las muchas consideraciones importantes necesarias para cuidar de forma segura a los pacientes pediátricos [9].

Una cita de sedación en un consultorio o clínica dental implica varios pasos, todos los cuales siguen un protocolo que abarca: el proceso de consentimiento informado, las instrucciones preoperatorias, el historial previo a la sedación y examen físico, pesaje, administración del agente sedante por vía oral, la espera de un período de latencia, la colocación del niño en el sillón dental, monitorización, procedimiento dental, recuperación, instrucciones postoperatorias y el alta. Los niños seleccionados para la sedación suelen ser sanos (ASA I), niños que tienen afecciones médicas cuyo riesgo es moderado o grave podrían recibir sedación en entornos únicamente hospitalarios [4, 10]. El uso de oxímetro de pulso, tensiómetro, estetoscopio y capnografía son los estándares médicos requeridos durante los niveles mínimos y moderados de sedación [11]. La duración del tratamiento odontológico varía entre 20 minutos y 2 horas según las necesidades dentales del paciente. La recuperación generalmente se realiza en el sillón dental o en una sala acondicionada bajo observación y supervisión

directa de los padres y el personal dental. Las Academia Estadounidense de Pediatría (AAP) y la Academia Estadounidense de Odontología Pediátrica (AAP) recomiendan utilizar hojas de registro de sedación estandarizadas durante el procedimiento de sedación [12].

Sedantes utilizados en odontología pediátrica

En base a los estudios dentales pediátricos revisados de la literatura, se observan que los sedantes usados en odontología pueden ser: hidrato de cloral, meperidina y midazolam, utilizados junto con otros agentes como la hidroxicina; además, otras referencias mencionan a las benzodiazepinas como diazepam y triazolam [13].

Hidrato de cloral

Es uno de los sedantes más antiguos empleados para sedación, se popularizó a mediados de la década de 1950, y todavía sigue siendo muy popular en algunas partes del mundo, sin embargo, su uso está disminuyendo debido a las preocupaciones sobre la genotoxicidad y carcinogenicidad. Es actualmente clasificado como un fármaco hipnótico que induce sueño en el paciente pediátrico, este compuesto se absorbe rápidamente después de la administración oral, se convierte en su forma activa (tricloroetanol), y se metaboliza en el hígado para posteriormente excretarse por vía renal. El tricloroetanol es un depresor del Sistema Nervioso Central [14].

El hidrato de cloral es un irritante de las mucosas y estómago, motivo por el cual su uso se contraindica en pacientes con esofagitis, gastritis e inflamación duodenal [15]. Los efectos adversos descritos asociados a su uso incluyen: laringoespasmo, parada cardiorespiratoria y arritmias cardiacas. Este fármaco rara vez se administra solo en niños que se someten a procedimientos dentales, por lo general, se mezcla con hidroxicina que ayuda a minimizar el vómito y profundiza el nivel de sedación. Otra combinación utilizada es el hidrato de cloral con meperidina y hidroxicina, esta combinación produce sedación moderada, sin embargo, un porcentaje de niños pueden entrar en una sedación profunda por lo que se recomienda precaución en su uso. Siempre que los agentes sedantes se combinen entre sí, se recomienda disminuir la dosis terapéutica de cada agente [16].

Comportamiento clínico del niño: en dosis terapéuticas (10-50 mg/kg) se observa una primera etapa de hiperexcitabilidad leve dentro de los 20 a 30 minutos posteriores a la administración del fármaco, tras esta hiperactividad la somnolencia comienza a dominar. En algunas ocasiones la etapa de hiperexcitabilidad no disminuye y hace que el desempeño del clínico sea un desafío [17].

Tabla 1. Resumen de las consideraciones habituales de dosificación, advertencias, consideraciones y agentes de reversibilidad para sedación oral.

Familia/ Medicación	Dosificación	Advertencias de uso	Consideraciones de tiempo de trabajo	Reversibilidad	Referencias
Sedante: Hidrato de Cloral	Dosis única: 10 a 50 mg/kg	Laringoespasmo Arritmia cardiaca Paro cardiorrespiratorio.	Inicio: 30 - 45 minutos Efecto máximo: 45 minutos Tiempo de trabajo: 1 - 1,5 horas	Medicación no reversible	[14-17]
Analgésico opiáceo: Meperidina	Dosis única: 1 - 2 mg/kg	Depresión respiratoria Convulsiones Coma	Inicio: 20 - 30 minutos. Efecto máximo: 30 minutos Tiempo de trabajo: 1 hora	Reversible con Naloxona	[18, 19]
Benzodiazepina: Midazolam	Dosis única: 0,3 – 1,0 mg/kg	Depresión respiratoria. Alergias Reacciones paradójicas	Inicio: 10 minutos. Efecto máximo: 10 minutos Tiempo de trabajo: 20 minutos	Reversible con Flumazenil	[20, 21]

Meperidina

La meperidina es un agonista opioide sintético con propiedades analgésicas, presenta aproximadamente una décima parte de la potencia de la morfina, sin embargo, es equivalente a la morfina en términos del grado de sedación y depresión respiratoria. Este fármaco en altas dosis puede causar convulsiones. De hecho, existe evidencia que dosis altas de meperidina que interactúan con dosis altas de anestésicos locales pueden inducir convulsiones seguidas de depresión respiratoria e incluso el coma [18]. Este fármaco se metaboliza en el hígado y se excreta a nivel renal. Los opioides incluida la meperidina, estimulan la zona de activación de los quimioreceptores en la médula, lo que provoca náuseas y vómito, debido a este efecto secundario se administra combinado con un antiemético como la hidroxicina.

Comportamiento clínico del niño: el inicio de los efectos tras su administración oral en el entorno dental, se puede apreciar entre 20 a 30 min, y el tiempo de trabajo podría extenderse de 45 minutos a una hora. Las ventajas de la meperidina se aprecian como fármaco mediador de los cambios de humor y analgesia leve. La combinación de meperidina con midazolam resulta beneficiosa por que los efectos primarios de cada uno de los agentes pueden producir un mejor resultado clínico. Sin embargo, es importante señalar que dosis más altas de esta combinación pueden causar somnolencia o sedación profunda, lo que puede comprometer la capacidad funcional de las vías respiratorias. La meperidina y el midazolam se pueden revertir con naloxona y flumazenil respectivamente con administraciones intramusculares [18, 19].

Benzodiazepinas

Son agentes sedantes que característicamente tienen propiedades que causan grados variables de inhibición motora, efectos hipnóticos (inductores de sueño), anticonvulsivos y ansiolíticos. Las propiedades de las benzodiazepinas son tales que cada una puede poseer algunos o todos los efectos. Estos fármacos actúan en el Sistema Nervioso Central, se metabolizan a través del sistema enzimático microsomal hepático y se excretan principalmente por vía renal. Se debe tener precaución para prevenir posibles situaciones adversas siempre que se administren benzodiazepinas en presencia de otros agentes o sustancias que interactúan con el sistema de enzimas microsomal [20]. La benzodiazepina que se utiliza con mayor frecuencia para la sedación pediátrica es el midazolam, de este último se hará énfasis en el comportamiento clínico.

Comportamiento clínico del niño: el midazolam tiene un inicio rápido y una acción de corta duración, no posee propiedades analgésicas. Normalmente los cambios en el comportamiento del paciente se pueden percibir en menos de 10 minutos, el niño se manifiesta menos activo y más callado, para más adelante hacerse evidente la relajación de las

extremidades e incluso una menor movilidad. El niño puede volverse clínicamente flácido e incapaz de ponerse de pie o sentarse, pero aun así mantiene contacto visual.

Parámetros respiratorios y cardiovasculares suelen permanecer dentro de los rangos clínicos apropiados, este fármaco es un buen agente para procedimientos dentales cortos, es posible que el niño no tolere procedimientos largos y que dominen los comportamientos perturbadores [21].

Es importante destacar que las benzodiazepinas pueden causar somnolencia, depresión respiratoria, alergias y probablemente lo más importante para la sedación en niños es la presencia de reacciones paradójicas. Paradójicamente el paciente se excita en mayor medida, presentando cambios clínicos como agitación, irritabilidad, hiperactividad, rabia y hostilidad. Reacciones paradójicas tardías se han manifestado entre 30 a 40 minutos después de la administración del fármaco, y suelen durar entre 1 a 3 horas. Otras respuestas relacionadas con este fármaco incluyen el "Síndrome del niño enojado" en aproximadamente 20% de los casos [20, 21].

El diazepam y el triazolam son otras dos benzodiazepinas que se usan en pacientes pediátricos, para procedimientos dentales más prolongados en preescolares mayores y niños en edad escolar. El Flumazenil es un antagonista de los receptores de benzodiazepinas, y puede revertir las dosis terapéuticas de los efectos de las benzodiazepinas en aproximadamente 1 minuto al ser administrado por vía intravenosa. La administración de agentes de reversión requiere un seguimiento de atención posoperatoria prolongada, por el riesgo de efectos de re–sedación [21].

Combinación de agentes sedantes en regímenes de sedación clínica

Se han estudiado y utilizado en la práctica clínica varios agentes de sedación al ser administrados por vía oral, sin embargo, es preciso manifestar que se dispone de poca evidencia sustancial derivada de estudios científicos organizados, aleatorizados y bien controlados para respaldar la combinación de agentes sedantes. La bibliografía actual describe los efectos de los diferentes agentes farmacológicos en el comportamiento y fisiología infantil, no obstante al ser considerados los fármacos en conjunto, se carece de información sustancial y un proceso estandarizado. Posiblemente hasta que se puedan diseñar y probar ensayos sistemáticos, el proveedor de salud oral seguirá utilizando modelos de selección farmacológica basados en la experiencia clínica. Los resultados de la sedación administrada por vía oral en niños, no se pueden predecir fácilmente debido a muchos factores confluyentes: antecedentes médicos, edad cognitiva, atributos emocionales, temperamentales y evaluación física. Podría ser posible establecer que los dos factores más críticos en el proceso de toma de decisiones sobre los agentes farmacológicos combinados son el temperamento del paciente y el tiempo de tratamiento

planificado. Es así que la selección de un solo fármaco o una combinación de fármacos para un paciente infantil siempre será un desafío formidable, un fármaco utilizado como agente único puede producir efectos ventajosos, sin embargo, al mismo tiempo puede estar limitado por la duración del tiempo de acción, por lo cual, combinar fármacos cuyos efectos sean complementarios ha sido una línea guía [22-24].

Muchos de los agentes "comunes", como midazolam, hidrato de cloral, meperidina e hidroxicina pueden combinarse para su uso. El hidrato de cloral cuando se usa en combinación con hidroxicina, sigue un régimen farmacológico de 20 a 40 mg/kg de hidrato de cloral y de 1 a 2 mg/kg de *hidroxicina*. Otro régimen eficaz es la combinación de hidrato de cloral, meperidina e hidroxicina. El rango de dosificación de esta combinación particular es típicamente de 15 a 25 mg/kg de hidrato de cloral, 1 a 2 mg/kg de meperidina y 0,5 a 1 mg/kg de hidroxizina. Los estudios han demostrado que esta técnica de "combinación triple" es relativamente eficaz y segura. Sin embargo, algunos eventos posoperatorios pueden generar cierta preocupación [16, 25]. El concepto detrás de esta combinación es que los tres agentes inducen grados variables de somnolencia de una manera dependiente de la dosis. La meperidina también proporciona euforia y analgesia, reduciendo la cantidad de anestésico local necesario. La hidroxicina proporciona cierta protección contra la irritación de las mucosas y los vómitos. El tiempo de inicio efectivo suele ser de 45 minutos y proporciona sedación entre 60 a 90 minutos, tiempo suficiente para procedimientos a nivel de restauración [17, 25, 26].

En los últimos años, el midazolam ha superado al hidrato de cloral en popularidad como el agente sedante oral más utilizado en odontología pediátrica. Si bien se administra con mayor frecuencia por vía oral, la vía intranasal también se suele usar con frecuencia. Una de las deficiencias del midazolam administrado por vía oral es su corto tiempo de trabajo que se limita aproximadamente a 20 minutos de cuidados restauradores. Su ventaja es su inicio de acción (10 minutos o menos) cuando se administra por esta vía. Es el fármaco sedante de elección para casos de extracción o restauraciones pequeñas. El midazolam se combina con frecuencia con otros sedantes y analgésicos. Uno de los propósitos principales de combinar estos agentes es aumentar el tiempo de trabajo restaurador, aprovechar las propiedades de los medicamentos individuales (por ejemplo, la propiedad analgésica de la meperidina cuando se usa con midazolam, que no tiene propiedades analgésicas) y utilizar efectos aditivos o potenciadores de múltiples agentes, cada uno de los cuales puede usarse en dosis más bajas. La dosis de midazolam administrado por vía oral cuando se usa solo varía de 0,3 a 1,0 mg/kg. Cuando se combina con otros agentes, la dosis generalmente disminuye en el rango de 0,3 a 0,5 mg/kg. Asimismo, en terapia combinada, la dosis de la meperidina se reduce y varía desde 1 mg/kg [24, 27].

Consideraciones para evitar reacciones tóxicas a la anestesia local durante la sedación oral

La dosis máxima de anestésico local que se administrará al niño debe calcularse y registrarse cuidadosamente durante cualquier tratamiento dental y más aún cuando se emplean agentes farmacológicos sedantes. El uso de anestesia local durante la sedación pediátrica se considera un requisito absoluto para la comodidad del paciente. De hecho, la anestesia profunda durante el tratamiento a menudo mejora el resultado de una cita de sedación pediátrica. Sin embargo, los clínicos deben conocer el efecto de los agentes sedantes sobre la acción y el metabolismo de los agentes anestésicos locales. Esto es especialmente importante cuando se utilizan agentes sedantes que podrían producir depresión respiratoria. Todos los agentes sedantes son capaces de causar depresión respiratoria cuando se administran en dosis suficientemente grandes. Pero, los agentes con mayor probabilidad de causar depresión respiratoria son los opioides, así como las técnicas sedantes que utilizan más de un agente, como el "cóctel triple".

La depresión respiratoria conduce a hipoxemia, hipercapnia y acidosis respiratoria que se manifiesta con la disminución del pH sérico. La hipercapnia a su vez conduce a un aumento de la perfusión cerebral y una mayor distribución del agente anestésico local al cerebro, esto ocurre porque la acidosis respiratoria causa una disminución en la unión a proteínas plasmáticas, lo que resulta en una mayor liberación de un agente anestésico local en el plasma, para su redistribución a nivel cerebral. Además, la acidosis respiratoria complica aún más la recuperación, ya que es más probable un paro cardíaco, por el empeoramiento de la hipoxia, acidosis respiratoria e hipercapnia [28].

La evidencia de la sedación en odontología pediátrica

La práctica dental basada en evidencias científicas hoy en día es imperante; la crítica de la literatura y los metaánalisis han pasado a primer plano en todos los aspectos de la práctica médica y odontológica. Esta solidez de la evidencias lógicamente es criticada, evaluada e informa a los clínicos sobre las pautas a seguir. No es fácil llevar a cabo investigaciones sobre sedación dental pediátrica y se podría argumentar que los ensayos aleatorizados controlados con placebo no son éticos. Por lo tanto, el valor de la revisión bibliográfica es servir como recordatorio de que se debe tener precaución en la interpretación de los estudios de sedación. Muchos de los agentes sedantes pueden emplearse solos o en combinaciones como se mencionó con anterioridad. El midazolam puede ser uno de los pocos agentes que se utilizan habitualmente como agente único en niños, siendo el agente sedante más utilizado en odontología pediátrica, exceptuando el uso del óxido nitroso. Generalmente, este agente se emplea en procedimientos dentales que duren menos de 20 minutos de tiempo de trabajo y se considera relativamente seguro cuando se administra por vía oral. Entre los efectos adversos de su consumo encontramos la presencia de hipo, el cual se resuelve entre 20 a 30 minutos posteriores

a la administración. En una proporción menor de pacientes se presenta excitación paradójica o "síndrome del niño enojado", los intentos del clínico de razonar con un niño durante este efecto son infructuosos, sin embargo, la situación puede revertirse con un agente de reversión de las benzodiacepinas como el flumazenil. Cabe destacar que aunque se puede revertir el estado de hiperexitación, el efecto de reversión es temporal y es posible que el resurgimiento del estado ocurra una vez que el niño haya regresado a casa. En consecuencia, es aconsejable que el paciente permanezca en las instalaciones durante un periodo de tiempo más largo para tratar cualquier problema asociado con la reaparición del agente sedante. El tiempo de trabajo generalmente de 20 minutos puede aumentarse agregando otro agente con propiedades sedantes como meperidina, sin embargo, la profundidad de la sedación también aumenta y es necesaria una reducción de la dosis de ambos agentes.

Cuando se combinan agentes, el tiempo de latencia generalmente variará dependiendo de la mezcla. El midazolam y la meperidina con o sin óxido nitroso se pueden considerar como una combinación, está combinación produce sedación y añade algo de analgesia a la mezcla en función de las características de los dos fármacos. Un estudio prospectivo sugiere que se observa poca diferencia en el comportamiento del niño al comparar midazolam en una dosis más alta con midazolam en una dosis más baja y combinado con meperidina [29]. El hipo ocurrió con menos frecuencia con la combinación que cuando se usó midazolam solo. Otro estudio retrospectivo indicó que se produjeron diferentes efectos conductuales al variar las dosis de los dos fármacos [30]. Aunque esta puede ser una combinación útil, estudios de dosis más prospectivos, aleatorizados y controlados que involucren un tamaño de muestra mucho mayor pueden ser beneficiosos para discriminar los rangos de dosis óptimos para niños de diferentes estilos temperamentales.

Shapira comparó a través de un estudio clínico prospectivo, la efectividad del midazolam oral con y sin hidroxicina, al sedar a niños pequeños para tratamiento dental. Independientemente del tipo de medicación los pacientes mostraron un comportamiento tranquilo al inicio del tratamiento, con un aumento del llanto y movimiento hacia el final del mismo. En cuanto al movimiento se observó una diferencia significativa durante los primeros 20 minutos entre los dos regímenes. El uso de midazolam como agente único, mostró más niños exhibiendo movimiento y durante los primeros 30 minutos más niños lloraron en este grupo. Mientras que la combinación de midazolam más hidroxicina, mostró mayor número de niños dormidos o tranquilos, no se encontraron diferencias significativas entre los dos regímenes con respecto al éxito. Concluyen que el uso de la combinación de midazolam con hidroxicina podría ser más ventajosa en comparación al empleo de midazolam solo, respectivamente [31].

Un estudio de Toomarian y cols. compararon los efectos conductuales y fisiológicos de tres regímenes de fármacos sedantes en niños de 24 a 72 meses que exhibían un comportamiento definitivamente negativo. Se administraron al azar meperidina oral, meperidina submucosa y midazolam oral, durante tres citas consecutivas con un diseño cruzado, las tasas de éxito fueron de 50% (meperidina submucosa), 46,7% (meperidina oral) y 26,7% (midazolam oral) respectivamente. Se demostró que los tres regímenes eran seguros dentro de los límites del estudio actual. Se consideró más eficaz la sedación con meperidina en ambas vías [32]. Por otro lado, al comparar el efecto clínico único de la meperidina de acuerdo a vías de administración diferentes se cita el estudio de Cathers, quien comparó la seguridad y la eficacia de la meperidina administrada por vía submucosa y la meperidina oral. Ambos regímenes se utilizaron junto con hidroxicina oral para la sedación de niños preescolares poco cooperativos. Se utilizó un diseño cruzado para que cada paciente recibiera ambos regímenes. Los signos vitales se mantuvieron estables durante ambos tratamientos, los principales efectos secundarios notificados durante la inyección submucosa incluyeron dolor (58%) y edema (26%). El éxito fue del 63% en el grupo de meperidina submucosa y 80% en el grupo de meperidina oral [33].

Un ensayo aleatorizado doble ciego de diseño cruzado a cargo de Da Costa, evaluó el efecto del hidrato de cloral más hidroxicina, versus hidrato de cloral solo, versus un placebo. Se llevaron a cabo 35 sesiones de sedación dental en 12 niños ASA I menores de 5 años que no cooperaron. En cada sesión los pacientes recibieron aleatoriamente cada uno de los tres regímenes. Los signos vitales y las variables de comportamiento se evaluaron cada 15 minutos. Las comparaciones se analizaron estadísticamente mediante las pruebas de Friedman y Wilcoxon. El autor reportó que los tres regímenes no tuvieron diferencia en cuanto a la monitorización de los signos vitales, excepto en la frecuencia respiratoria. El uso de hidrato de cloral solo e hidrato de cloral más hidroxicina promovieron más sueño en los primeros 30 minutos de tratamiento. El comportamiento general fue mejor en hidrato de cloral y hidrato de cloral más hidroxicina que con el placebo. Hidrato de cloral, hidrato de cloral más hidroxicina y placebo fueron efectivos en 62,5%, 61,5% y 11,1 % de los casos, respectivamente. Concluyeron que el hidrato de cloral fue seguro y relativamente eficaz, lo que provocó resultados fisiológicos y de comportamiento más satisfactorios que un placebo [34]. Las famosas combinaciones triples fueron comparadas en el estudio prospectivo de Sheroan y cols., con la finalidad de determinar los efectos conductuales y fisiológicos, de dos regímenes de sedación: régimen A (hidrato de cloral + meperidina + hidroxicina), versus régimen B (midazolam + meperidina + hidroxicina), encontrando que no existieron diferencias significativas, entre los regímenes A y B para los resultados conductuales o los parámetros fisiológicos [35-39].

Bases legales de la sedación y anestesia general en diversas regiones

Directrices en Estados Unidos

Desde el año 2007, la Asociación Dental Estadounidense (ADA) publicó las pautas para la enseñanza del control del dolor para dentistas, junto con un conjunto separado de pautas para el uso de sedación y anestesia general en el consultorio odontológico. Ambas directrices se han modificado y adoptado recientemente en el año 2016 y fomentan las modalidades psicológicas y farmacológicas de atención. Directrices conjuntas más recientes de la Academia Americana de Pediatría y la Academia Americana de Odontopediatría hacen hincapié, entre otros conceptos, en la seguridad y el rescate del paciente, así como en la educación y formación de los profesionales. La formación especializada en odontología pediátrica requiere un mínimo de dos años en América y tres años en Europa, Medio Oriente y el Lejano Oriente e incluye las experiencias didácticas y clínicas necesarias en el manejo farmacológico de los niños. En los EE. UU., según la Comisión de Acreditación Dental (CODA), el alcance de esas experiencias en el contexto clínico, la calidad y la cantidad ha variado notablemente de un programa a otro; y la estandarización de experiencias entre más de 70 programas de capacitación avanzada fue relativamente poco regulada y mínima. Sin embargo, como resultado de un informe de un grupo de trabajo encargado por la AAPD y la CODA cambiaron los estándares de acreditación relacionados específicamente con el entrenamiento en sedación. Hoy en día, el estándar CODA para todos los programas de capacitación avanzada en odontología pediátrica indica que cada alumno de especialidad dental pediátrica en los EE. UU., en cada programa debe participar en 50 experiencias de sedación. Además, debe ser el operador en 25 de los 50 casos. Este nuevo estándar debería repercutir en la calidad de la atención y aportar más coherencia y estandarización a la formación de los odontopediatras.

La inmensa mayoría de los programas en los EE. UU., enseñan principalmente el uso de sedación por vía oral, rara vez se enseña sedación intravenosa y, de ser así, un anestesiólogo dental o un cirujano oral y maxilofacial brindan esa atención. Las pautas de la AAP/AAPD indican específicamente que para la sedación profunda o la anestesia general, al menos dos personas deben tener la capacitación adecuada y una certificación actualizada en el rescate de pacientes. Una de las dos personas debe ser un observador independiente que no esté realizando o asistiendo con el procedimiento dental. Además, las pautas indican que el observador independiente debe ser un médico capacitado en sedación y habilidades avanzadas en las vías respiratorias (Médico Anestesiólogo) con la licencia y competencias. Es decir, el dentista que proporciona la sedación profunda puede realizar los procedimientos dentales si hay dos personas capacitadas en BLS presentes, una de las cuales está designada únicamente para monitorear al paciente,

toda sedación profunda o anestesia general requiere un mínimo de tres personas en EE. UU., incluido el dentista. Las juntas dentales estatales regulan la sedación realizada por los dentistas. La mayoría de los estados requieren que un dentista con licencia también tenga un permiso especial de sedación. Existen diferentes clasificaciones de permisos de sedación, como permisos para las vías de administración enteral versus parenteral. Por lo general, para todos los permisos se requiere la documentación de la capacitación, la realización de la sedación en presencia de un consultor de la junta y la inspección in situ de las oficinas [4, 6, 7, 40, 41].

Directrices en Reino Unido y Europa

La sedación por inhalación de óxido nitroso es el método más común para el manejo dental en el Reino Unido. La técnica, la formación y la idoneidad, para su uso en la práctica dental general, fueron afirmadas por una Directiva del Consejo Europeo de Dentistas en 2019. Europa es un grupo de países culturalmente diversos, cada uno con leyes, recomendaciones y marcos específicos para la prestación de servicios dentales. A pesar de esto, cada estado miembro de la Unión Europea está sujeto a la legislación de la misma. El papel de la Asociación Internacional de Odontología Pediátrica (IAPD) y la Academia Europea de Odontología Pediátrica (EAPD) ha sido clave para criterios de unanimidad. En pocas palabras, la sedación para odontología pediátrica en estos estados es "consciente", esto significa que el niño permanece en contacto verbal con el médico durante todo el procedimiento. La popularidad del método y el sedante utilizado en cada país varía. La directriz del Instituto Nacional para la Excelencia en la Salud y la Atención (NICE) establece la definición de sedación consciente para la odontología. No existe una definición de "sedación profunda" para la odontología en el Reino Unido. Si no es "consciente", se considera anestesia general; como tal, se aplican las regulaciones relacionadas con el sitio, las instalaciones y el nivel de capacitación del personal. En resumen, se puede utilizar un fármaco o fármacos, el paciente debe estar despierto y en comunicación en todo momento, y la vía intravenosa se limita a adolescentes emocionalmente maduros [42-44].

Directrices en América del Sur

El uso de sedantes para procedimientos dentales por odontopediatras en Sudamérica ha aumentado en la última década. Aún así, la mayoría de los niños con problemas de manejo de la conducta y necesidades importantes de tratamiento dental se manejan mediante técnicas no farmacológicas, incluida la restricción física y la odontología de mínima intervención. Las encuestas de poblaciones sudamericanas han mostrado resultados alentadores con respecto a la percepción de los padres de las técnicas farmacológicas. En Colombia, la aceptación de los padres de la sedación con óxido nitroso es de 89,1%, 35,9% de anestesia general, 53,5% de restricción física por parte de los individuos y

38,7% que usa restricción física con un dispositivo (tabla de papoose). Además, los padres colombianos creen que al 92.0% de los niños de 4 a 12 años les gustó la sedación con óxido nitroso. Algunos países de América del Sur tienen reglas que guían la práctica de la sedación por parte de los dentistas. En odontología pediátrica, algunos informes sobre sedación sugieren que los dentistas sean los encargados de administrar la sedación por inhalación con óxido nitroso, mientras que otras formas de sedación se han utilizado en los consultorios dentales junto con los anestesiólogos [44, 45].

Existe poca información sobre la oferta de sedación en los servicios públicos, pero es evidente que las prácticas privadas han buscado satisfacer la demanda de los padres en consultas dentales más cómodas. En muchas partes de América del Sur, los dentistas pueden recetar y administrar medicamentos. Existen regulaciones en algunos países que establecen las condiciones para que un dentista proporcione sedación dental [2, 46-48]:

- Brasil (Ley federal 5081, agosto 1966): Artículo 6. Permite al odontólogo emplear la analgesia y la hipnosis cuando constituyan métodos efectivos para el tratamiento odontológico.

- Brasil (Colegio de Cirujanos Dentistas, abril 2004): Establece normas para capacitar al odontólogo en la aplicación de analgesia relativa o sedación consciente con óxido nitroso. Los odontólogos deben realizar un curso de 96 horas crédito sobre el tema.

- Chile (Ministerio de Salud, Lineamientos para el manejo de ansiedad en la atención odontológica, 2007): Regula la sedación por inhalación de óxido nitroso en odontología.

- Colombia (Ministerio de Salud, resolución 1441, mayo 2013): Los odontólogos pueden realizar sedación mínima (nivel I) y moderada (nivel II) en el consultorio odontológico si no es el mismo operador que realiza el procedimiento odontológico, debe estar certificado en Soporte Vital Básico (BLS, renovado cada 2 años) y en sedación fuera de quirófano; las enfermeras pueden ayudar en el seguimiento del paciente. La sedación profunda (nivel III) requiere una formación y aparatos más sofisticados, incluidas certificaciones de soporte vital avanzado (ACLS). El nivel IV (anestesia general) solo puede ser administrado por anestesiólogos. Los dentistas deben tener capacitación teórica y clínica para usar el óxido nitroso en el consultorio dental.

- Perú (Código de ética dental, diciembre 2009): Los dentistas pueden recetar medicamentos que contienen sustancias estupefacientes, drogas psicotrópicas u otras

sustancias controladas. La anestesia general para el tratamiento dental debe ser realizada por un médico especialista anestesiólogo.

- En el caso de otros países de la región como Ecuador se reportan pocos estudios sobre sedación y se enmarcan en las directrices internacionales de Estados Unidos y la Unión Europea.

Esto pone en evidencia que existen países en donde los odontólogos no están obligados a tener una formación específica en anestesia o sedación, siendo está situación a tener muy en cuenta por los posibles efectos adversos o complicaciones que pueden generar los fármacos usados durante la sedación; por lo tanto, es menester de todos los países de la región poseer reglas claras que permitan regular y controlar la sedación a nivel dental y así obtener procedimientos seguros y eficaces.

Conclusiones

La sedación dental pediátrica es una herramienta que solo podrá ser utilizada con éxito en manos de un profesional capacitado que logre encapsular de manera idónea la planificación del tratamiento, la experiencia en el manejo del comportamiento, el procedimiento indoloro y la sedación. Es esencial en todo este ámbito reforzar la idea sobre la atención preventiva, misma que es parte del plan de atención de todo paciente infantil, pues a menudo los niños que llegan a intervenciones sedativas se encuentran en estados avanzados de la enfermedad, de ahí la importancia de generar estrategias locales y nacionales de prevención que permitan atención dental indolora y sin estrés.

La diversidad de puntos de vista y técnicas aplicadas al paciente pediátrico, refleja la variabilidad cultural y expectativas de los padres. Algunos padres perciben que si se completó el tratamiento necesario, se consiguió un resultado exitoso, independientemente de las técnicas aplicadas y la respuesta del niño. Otros padres rechazan la sedación y métodos alternativos de intervención y optan por no buscar atención, llevando a consecuencias fatales en la salud dental de sus hijos. Algo concreto y cierto es que la enfermedad dental no tratada no retrocede, al contrario está en constante progreso a condiciones más complejas como abscesos o celulitis que incluso ponen en peligro la vida de un niño. En el futuro la sedación de los niños para procedimientos dentales seguirá estando influenciada por las demandas de la sociedad, las agencias reguladoras, las directrices internacionales, las implicaciones financieras, las opciones alternativas y la formación profesional. Los cambios en la formación profesional con programas especializados centrados en pediatría son un paso crítico y esencial para conseguir períodos

de entrenamiento, intensos y prolongados en las técnicas sedativas, que permitan mejorar las condiciones de atención clínica.

Conflicto de interés

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

Referencias

1. S. Wilson, A survey of the American Academy of Pediatric Dentistry membership: Nitrous oxide and sedation, *Pediatr. Dent.*, **18**(4), 287-293 (1996).

2. R.L. Mawhinney, A. Hope, Sedation for dental and other procedures, *Anesthesia and Intensive Care Medicine*, **21**(9), 437-440 (2020).

3. P.G. Firth, C.L. Mai, The evolution of pediatric sedation and anesthesia patient safety: An interview with Dr Charles J. "Charlie" Coté, *Paediatr. Anaesth.*, **30**(11), 1183-1190 (2020).

4. C.J. Coté, S. Wilson; American Academy of Pediatrics; American Academy of Pediatric Dentistry, Guidelines for monitoring and management of pediatric patients before, during, and after sedation for diagnostic and therapeutic procedures, *Pediatrics*, **143**(6), e20191000 (2019).

5. C.R. Bennett, *Conscious-sedation in dental practice*, CV Mosby, St. Louis (MO), 1978, pp. 194-195.

6. American Dental Association, *Guidelines for teaching pain control and sedation to dentists and dental students*, Adopted by the ADA House of Delegates, 2016, 18 p.

7. American Dental Association, *Guidelines for the use of sedation and general anesthesia by dentists*, Adopted by the ADA House of Delegates, 2016, 15 p.

8. W.D. Owens, J.A. Felts, E.L. Spitznagel, ASA physical status classifications: a study of consistency of ratings, *Anesthesiology*, **49**(4), 239-243 (1978).

9. B.A. Dye, G. Thornton-Evans, X. Li, T.J. Iafolla, Dental caries and sealant prevalence in children and adolescents in the United States, 2011–2012, *NCHS Data Brief*, **191**, 1-8 (2015).

10. S.M. Alrayyes, N. Capezio, E. Kratunova, C.W. LeHew, S. Alapati, Factors associated with moderate sedation attendance at a university-based pediatric dental clinic, *J. Dent. Educ.*, **85**(12), 1821-1827 (2021).

11. J. Sado-Filho, K.A. Viana, P. Corrêa-Faria, L.R. Costa, P.S. Costa, Randomized clinical trial on the efficacy of intranasal or oral ketamine-midazolam combinations compared to oral midazolam for outpatient pediatric sedation, *PLoS One*, **14**(3), e0213074 (2019).

12. S. Wilson, M. Houpt, Project USAP 2010: Use of sedative agents in pediatric dentistry-a 25-year follow-up survey, *Pediatr. Dent.*, **38**(2), 127-133 (2016).

13. P.F. Ashley, M. Chaudhary, L. Lourenço-Matharu, Sedation of children undergoing dental treatment, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **12**(12), CD003877 (2018).

14. K.M. Garrett, J. Gan, Enhancement of gamma- aminobutyric acid receptor activity by alpha- chloralose, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**(2), 680-686 (1998).

15. K.L. Donovan, D.J. Fisher, Reversal of chloral hydrate overdose with flumazenil, *BMJ*, **298**(6682), 1253 (1989).

16. A. Huang, T. Tanbonliong, Oral sedation Postdischarge adverse events in pediatric dental patients, *Anesth. Prog.*, **62**(3), 91-99 (2015).

17. D. Martinez, S. Wilson, Children sedated for dental care: a pilot study of the 24-hour postsedation period, *Pediatr. Dent.*, **28**(3), 260-264 (2006).

18. S.M. Roberts, C.F. Wilson, N.S. Seale, A.G. McWhorter, Evaluation of morphine as compared to meperidine when administered to the moderately anxious pediatric dental patient, *Pediatr. Dent.*, **14**(5), 306-313 (1992).

19. J.E. Nathan, K.G. Vargas, Oral midazolam with and without meperidine for management of the difficult young pediatric dental patient: a retrospective study, *Pediatr. Dent.*, **24**(2), 129-138 (2002).

20. Y.H. Shin, M.H. Kim, J.J. Lee, S.J. Choi, M.S. Gwak, A.R. Lee, M.N. Park, H.S. Joo, J.H. Choi, The effect of midazolam dose and age on the paradoxical midazolam reaction in Korean pediatric patients, *Korean J. Anesthesiol.*, **65**(1), 9-13 (2013).

21. J.C. Sanders, Flumazenil reverses a paradoxical reaction to intravenous midazolam in a child with uneventful prior exposure to midazolam, *Paediatr. Anaesth.*, **13**(4), 369-370 (2003).

22. L. Matharu, P.F. Ashley, Sedation of anxious children undergoing dental treatment, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **25**(1), CD003877 (2006).

23. D.E. Becker, K.L. Reed, Local anesthetics: review of pharmacological considerations, *Anesth. Prog.*, **59**(2), 90-101 (2012).

24. P.F. Ashley, M. Chaudhary, L. Lourenço-Matharu, Sedation of children undergoing dental treatment, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **12**(12), CD003877 (2018).

25. J. Chowdhury, K.G. Vargas, Comparison of chloral hydrate, meperidine, and hydroxyzine to midazolam regimens for oral sedation of pediatric dental patients, *Pediatr. Dent.*, **27**(3), 191-197 (2005).

26. N. Chen, T. Tanbonliong, Comparison of two morphine- benzodiazepine-hydroxyzine combinations for the oral sedation of pediatric dental patients: a retrospective study, *Pediatr. Dent.*, **40**(1), 43-48 (2018).

27. U. Klein, B.A. Bucklin, T.J. Poulton, D. Bozinov, Nitrous oxide concentrations in the posterior nasopharynx during administration by nasal mask, *Pediatr. Dent.*, **26**(5), 410-416 (2004).

28. W. Liu, X. Yang, C. Li, A. Mo, Adverse drug reactions to local anesthetics: a systematic review, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, **115**(3), 319-327 (2013).

29. K.M. Musial, S. Wilson, J. Preisch, J. Weaver, Comparison of the efficacy of oral midazolam alone versus midazolam and meperidine in the pediatric dental patient, *Pediatr. Dent.*, **25**(5), 468-474 (2003).

30. A.M. Al-Ojaili, V. Gowri, Clinical profile of patients operated for benign adnexal tumors and the histopathological types, *Saudi Med. J.*, **24**(12), 1334-1336 (2003).

31. J. Shapira, A. Kupietzky, A. Kadari, A.B. Fuks, G. Holan, Comparison of oral midazolam with and without hydroxyzine in the sedation of pediatric dental patients, *Pediatr. Dent.*, **26**(6), 492-496 (2004).

32. L. Toomarian, K. Salem, G. Ansari, Assessing the sedative effect of oral vs submucosal meperidine in pediatric dental patients, *Dent. Res. J.* (*Isfahan*), **10**(2), 173-179 (2013).

33. J.W. Cathers, C.F. Wilson, M.D. Webb, M.E. Alvarez, T. Schiffman, S. Taylor, A comparison of two meperidine/hydroxyzine sedation regimens for the uncooperative pediatric dental patient, *Pediatr. Dent.*, **27**(5), 395-400 (2005).

34. L.R. da Costa, P.S. da Costa, A.R. Lima, A randomized double-blinded trial of chloral hydrate with or without hydroxyzine versus placebo for pediatric dental sedation, *Braz. Dent. J.*, **18**(4), 334-340 (2007).

35. M.M. Sheroan, D.C. Dilley, W.J. Lucas, W.F. Vann, A prospective study of 2 sedation regimens in children: chloral hydrate, meperidine, and hydroxyzine versus midazolam, meperidine, and hydroxyzine, *Anesth. Prog.*, **53**(3), 83-90 (2006).

36. S.K. Mallineni, J.C. Bhumireddy, S. Nuvvula, Dentistry for children during and post COVID-19 pandemic outbreak, *Child Youth Serv. Rev.*, **120**, 105734 (2021).

37. E. Fauteux-Lamarre, M. McCarthy, N. Quinn, A. Davidson, D. Legge, K.J. Lee, G.M. Palmer, F.E. Babl, S.M. Hopper, Oral ondansetron to reduce vomiting in children receiving intranasal fentanyl and inhaled nitrous oxide for procedural sedation and analgesia: A randomized controlled trial, *Ann. Emerg. Med.*, **75**(6), 735-743 (2020).

38. M. Miyauchi, Y. Hama, S. Ono, M. Takechi, Intranasal midazolam conscious sedation for dental surgery in child with left ventricular noncompaction, *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.*, **33**, 165-168 (2021).

39. L. Bilder, S. Librov, Z. Gutmacher, I. Pasternak, I. Shavit, Adverse events during sedation for oro-dental trauma in an Israeli paediatric emergency department, *Dent. Traumatol.*, **38**(2), 156-159 (2022).

40. C. Oulis, M.T. Hosey, L. Martens, D. Hammer, J. Martínez, A. Raya, *The use of nitrous oxide inhalation sedation in dentistry*, CED Resolution, 2012. URL: https://www.pdfs.seman- ticscholar.org/96da/fdad1497b869406e-d59ba4d31e06f853b94a.pdf?_ga=2.257989711.475033693.1579488542-410930180.1579488542, accesado el 3 de septiembre de 2022.

41. M. Hanna, P. Chen, E. Clarkson, Update on medications for oral sedation in the oral and maxillofacial surgery office, *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*, **34**(1), 9-19 (2022).

42. National Institute for Health and Clinical Excellence, Sedation in children and young people (CG112); sedation for diagnostic and therapeutic procedures in children and young people, 2010. URL: http://guidance.nice.org.uk/CG112, accesado el 15 de septiembre de 2020.

43. C.C. Donnell, T. Flavell, K.E. Wilson, LARAGA – Pharmacological behaviour management in paediatric dentistry in the UK, *Pediatric Dental Journal*, **32**(2), 100-109 (2022).

44. N. Cordero, J.M. Cárdenas, L.G. Alvarez, Parental acceptance of pharmacologic and non-pharmacologic behavior management techniques in pediatric dentistry, *Rev. CES Odontol.*, **25**(2), 24-32 (2012).

45. E. Betancur, S. Londoño, C. Alvarez, J.M. Cárdenas, R. Manrrique, Evaluación de la aceptación de la técnica de sedación inhalada con óxido nitroso por parte de padres y niños entre los 4 y 12 años de edad, *Rev. CES Odontol.*, **19**(1), 33-37 (2006).

46. J. Norderyd, D. Faulks, G. Molina, M. Granlund, G. Klingberg, Which factors most influence referral for restorative dental treatment under sedation and general anesthesia in children with complex disabilities: caries severity, child functioning, or dental service organization? *Int. J. Paediatr. Dent.*, **28**(1), 71-82 (2018).

47. A. Daher, R.P. Hanna, L.R. Costa, C.R. Leles, Practices and opinions on nitrous oxide/oxygen sedation from dentists licensed to perform relative analgesia in Brazil, *BMC Oral Health*, **12**, 21 (2012).

48. E.M. Velez-León, K.L. Vargas, K. Cuenca-León, C. Acurio-Vargas, A. Zumba, E.M. Pacheco-Quito, Ambulatory sedation for dental procedures--Case of Cuenca, Ecuador, *Children* (*Basel*), **9**(11), 1618 (2022).

Cómo citar este artículo

G.J. Jiménez Terreros, M.C. Alvear-Córdova, M.I. Astudillo-Crespo, E.M. Pacheco-Quito, Sedación oral a nivel pediátrico aplicada en odontología, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 287-310 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101736

Article of scientific research / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109381*

Molecular insights into the binding mechanisms of human and mouse Glutamate-cysteine ligases

Ige Olaoye[1,2], Babatunde Oso[1a*], Adepeju Aberuagba[1,2b*]

[1] Department of Biochemistry, McPherson University, Seriki Sotayo, Nigeria.

[2] Department of Biochemistry, University of Ilorin, Ilorin, Nigeria.

*Corresponding authors:

[a] Department of Biochemistry, McPherson University; Km 96, Lagos-Ibadan Express way, Nigeria; +2348060625697; E-mail: basjoe08@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8667-7108

[b] Department of Biochemistry, McPherson University; Km 96, Lagos-Ibadan Express way, Nigeria; +2348068017723; E-mail: adepaberuagba@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1055-1407

Received: March 31, 2022

Corrected: December 1, 2022

Accepted: December 6, 2022

Summary

Background: the significant role of glutamate-cysteine ligase (GCL) towards the synthesis of glutathione for the sequestration of reactive species as a regulatory point is second to none. However, much still need to be known about the enzyme molecular characterization. Thus, the homology modeling of GCL was carried out using different modeling webserver tools. The quality of the predicted crystal structures of human and mouse GCLs with inhibition were further assessed on molecular interaction with naphthalene and its metabolites. **Results:** the predicted human GCL and mouse GCL model structures have respective 89.8% and 89.6% residues in the most favored region of the Ramachandran plot. However, the molecular docking interaction study with the assessed ligands revealed two different binding pockets with pi-interactions as major non-covalent bond and better binding scores than glutathione. **Conclusion:** the predicted model could provide better mechanism of GCL catalysis to preserve its essential residues for reasonable GSH synthesis.

Keywords: GSH, GCL, homology modeling, naphthalene, molecular docking.

Resumen

Información molecular sobre los mecanismos de unión de las ligasas de glutamato-cisteína humana y de ratón

Antecedentes: el importante papel de la glutamato-cisteína ligasa (GCL) en la síntesis de glutatión para el secuestro de especies reactivas como punto regulador es insuperable. Sin embargo, aún queda mucho por conocer acerca de la caracterización molecular de enzimas. Por lo tanto, el modelado de homología de GCL se llevó a cabo utilizando diferentes herramientas de servidor web de modelado. La calidad de las estructuras cristalinas predichas de los GCL humanos y de ratón con inhibición se evaluó más a fondo en la interacción molecular con el naftaleno y sus metabolitos. **Resultados:** las estructuras del modelo de GCL humano y GCL de ratón predichas tienen residuos respectivos del 89,8 % y el 89,6 % en la región más favorecida del diagrama de Ramachandran. Sin embargo, el estudio de interacción de acoplamiento molecular con los ligandos evaluados reveló dos bolsillos de unión diferentes con interacciones pi como enlace no covalente principal y mejores puntajes de unión que el glutatión. **Conclusión:** el modelo predicho podría proporcionar un mejor mecanismo de catálisis de GCL para preservar sus residuos esenciales para una síntesis razonable de GSH.

Palabras clave: GSH, GCL, modelado por homología, naftalina, acoplamiento molecular.

Resumo

Insights moleculares sobre os mecanismos de ligação de ligases de glutamato-cisteína humanas e de camundongos

Antecedentes: o papel significativo da glutamato-cisteína ligase (GCL) para a síntese de glutationa para o sequestro de espécies reativas como um ponto regulador é inigualável. No entanto, muito ainda precisa ser conhecido sobre a caracterização molecular da enzima. Assim, a modelagem de homologia do GCL foi realizada usando diferentes ferramentas de modelagem do servidor web. A qualidade das estruturas cristalinas previstas de GCLs humanos e de camundongos com inibição foi ainda avaliada na interação molecular com naftaleno e seus metabólitos. **Resultados:** as estruturas do modelo de GCL humano e GCL de camundongo têm resíduos respectivos de 89,8% e 89,6% na região mais favorecida do gráfico de Ramachandran. No entanto, o estudo da interação de docking molecular com os ligantes

avaliados revelou dois bolsos de ligação diferentes com interações pi como principal ligação não covalente e melhores pontuações de ligação do que a glutationa. **Conclusão:** o modelo previsto pode fornecer um melhor mecanismo de catálise de GCL para preservar seus resíduos essenciais para síntese razoável de GSH.

Palavras-chave: GSH, GCL, modelagem de homologia, naftaleno, docking molecular.

Introduction

Glutathione (GSH) is a tripeptide (γ-glutamyl–cysteinyl–glycine) the most abundant non-protein thiol in the cell that is ubiquitously expressed as a cellular antioxidant to prevent the adverse effects of excessive ROS [1]. It is also a cofactor for GPXs and GSTs [2]. Glutamate-cysteine ligase-catalytic subunit, glutathione synthase, and glutathione reductase have been demonstrated to be responsible for the synthesis of GSH [3]. Sequential actions glutamate-cysteine ligase (GCL) (EC 6.3.2.2) and GSH synthetase (EC 6.3.2.3) is a synthetic pathway that occurs in nearly all cell types in mammals that mostly leads to the generation of GSH. The catalytic ability and expression of GCL gene have been found to correlate with GSH synthesis. GCL is a heterodimer enzyme composing of catalytically active heavy subunit and a light (modifier) subunits. The heavy subunit contains all substrate binding sites which catalyzes the rate limiting step in de novo synthesis of GSH [4, 5]. It catalyzes the formation of a peptidic γ-linkage between the γ-carboxyl group of glutamate and amino group of cysteine. GCL is an important antioxidative enzyme, which could function in the reduction of hydrogen and lipid peroxides, detoxification of toxic electrophiles, and maintenance of cellular redox status [6]. The control of the metabolic processes involving GCL depends on the regulation of enzymes activity which can be achieved by altering the rate of GCL synthesis, degradation, induction, repression and the catalytic efficiency of the enzyme through feedback inhibition and modulation of the affinity of the catalytic subunit for substrates and inhibitors through the regulatory light (modifier) subunit.

Various physiological disorders such viral infections and marked increase in oxidative stress have been shown to compromise glutathione synthesis in mammals as they correlate with decreased levels of cellular GSH [3, 7]. Environmental electrophilic chemicals such as aromatic hydrocarbons, quinones, and heavy metals can induce oxidative stress through formation of adducts with variety of biological nucleophiles such as GSH and proteins. They can also induce the activation of redox signal transduction pathways leading to changes in the expression and activity of GCL [8].

These electrophiles include naphthalene, an indoor air pollutant that generate reactive species from its bio-activation to highly cytotoxic epoxide such as 1R, 2S-naphthalene oxide by cytochrome P450s: CYP2F2 and CYP2F4 respectively [9].

This study discusses the homolog modeling vis-a-vis structural characterization of human and mouse Glutamate-cysteine ligases and their respective interaction with an environmental electrophile: naphthalene and its metabolites.

Methodology

Homology modeling

The non-availability of the 3D crystal structures of glutamate-cysteine ligase in the protein data bank hinder the direct investigation of GCL through *in silico* approach. Thus, the modeling of the structure from different organisms was carried out. The human and mouse primary sequence of glutamate-cysteine ligase (GCL) with respective accession number ID: A0A2R8YEL6 and Q3UNA7 were retrieved from UniProt knowledgebase (UniProtKB) (https://www.uniprot.org/) [10]. These obtained primary sequences were used in the prediction of the secondary structures of GCL using the SOPMA webserver (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) [11]. However, the 3-dimensional structures of GCL were modeled using Swiss model webserver (https://swissmodel.expasy.org/interactive/) [12]. Two models were obtained for human and mouse GCLs, ranked and best obtained using their Z scores (-3.88 and -3.72 for human and mouse respectively) and the GMQE from the Swiss model results (Table 2). The best foreseen GCL models among the two models in human and mouse (model 1) were refined once through the $3D^{refine}$ web server to improve the quality of the protein (http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/) [13-15]. There were five refined models obtained for each input respective 3D structures of GCL. The online PROCHECK webserver (https://saves.mbi.ucla.edu/) [16, 17] and Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN) Swiss Model server (https://swissmodel.expasy.org/qmean/) [18] were used for the structural authentication and characterization of the five refined modeled GCLs for each organism source via the Ramachandran plot, verify 3D and RMS distances from planarity; and QMEAN Version 4.1.0 respectively to obtained the best model for each GCL organism models. In addition to the authentication of the GCL 3D structures, the ligand-binding sites of the best characterized refined models (the highest Ramachandran plot percentage) for each organism were scrutinized using COFACTOR (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/) [19].

In silico study

Ligand and protein molecule preparation

The SDF structures of naphthalene, 1-nitronaphthalene, 1-methylnaphthalene, 1,4-naphthoquinone, 1,2-naphthoquinone, naphthalene epoxide, glutathione with respective CIDs 931, 6849, 7002, 8530, 10667, 108063 and 124886 were retrieved from the PubChem database (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) [20]. The compounds were loaded on PyRx-Python Prescription 0.8 and converted to mol2 chemical format using Open babel [21]. All these compounds were selected individually, reduced energetically and autodocked to pdbqt format. The best characterized refined models of GCL for the three organisms: human glutamate-cysteine ligase (HGCL), and mouse glutamate-cysteine ligase (MGCL) were prepared individually for molecular docking. Each characterized refined 3D model was loaded on PyRx-Python Prescription 0.8, made molecule and converted to pdbqt format.

Molecular docking

The docking of the selected ligands to the best characterized refined GCL models and determination of binding affinities was carried out using PyRx-Python prescription 0.8 autodock vina tool [22]. Each autodocked model was selected with a single ligand at a time and run using blind docking approach and repeated for all ligands towards each model. The dimensions were set as grid center: x = -0.5583, y = 36.2078, z = -23.5008 for HGCL and x = 1.2726, y = 35.8790, z = -23.3508 for MGCL, with the grid size x = 65.2874, y = 67.1276, z = 73.0739 for HGCL and x = 80.3407, y = 76.7057, z = 71.5745 for MGCL. The first three ranking binding score results for all the ligands towards each GCL model obtained were selected and subjected to statistical analysis to see any significant difference among the GCL model-ligand interactions. The obtained statistical results were expressed as mean ± standard deviation of three determinations, analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) for mean differences between different ligands followed by Duncan post hoc correlation. The obtained autodocked files for all the ligands and the respective autodocked GCL models were visualized using Discovery Studio BIOVIA 2020 and the interaction views presented in 2D and 3D.

Results and discussion

Glutathione (GSH) is an indispensable and versatile metabolic tripeptide nonprotein thiol antioxidant in animal cells. It plays a significant role in metabolism, amino acid transport, and protection of the cell from reactive species and endogenous and exogenous toxic molecules [23]. Seelig *et al*. [24] and Chen *et al*. [25] reported the feedback

inhibition mechanism of GSH and adenosine triphosphate (ATP) on GCL via its smaller regulatory subunit [26]. The UniProt sequence analysis revealed that HGCL and MGCL contain 639 and 637 amino acid residues respectively (Figure 1). The result of the predicted secondary structure (Table 1 and Figures 2, 3 and 4) revealed the repetitive arrangements in space of adjacent amino acid residues in the GCL [27]. Also, the predicted secondary structure results showed that the proteins exist in four states namely; α-helix, random coil, extended strand and beta turn for both human and mouse. The percentage formation of these four states are respectively 41.94, 40.53, 12.99 and 4.54 for human; and 41.29, 40.82, 12.72 and 5.18 for mouse suggesting a better description of protein residues alignment [28] as well as better stability of the protein due to high degree of coil formation [27]. The swiss models (model 1 which had the highest scores) for respective human and mouse with GMQE and QMEAN scores 0.75 and -3.88 respectively and 0.76 and -3.72 respectively using *Saccharomyces cerevisiae* GCL (PDB ID: 3IG5; resolution 2.10 Å) as template were used for the modeling (Table 2, Figure 5). These closest respective GMQE, QMEANDisco (between 0 and 1) and QMEAN Z-score (between -4.0 and 0) values for human and mouse GCL models suggested a good quality, reliability and the degree of nativeness of the built models to the experimental structure of similar size [18, 29, 30]. In addition to the model quality result, the percentage sequence identity matrix for GCL model 1 are 44.76% and 45.67% for human and mouse respectively confirming the sequence similarity of GCL 1 models. The plot of the predicted local similarity to target against the residue number of the predicted 3D model structure (Figure 5) depicted a good estimate of local quality of the residues of the predicted model since most of the residues values are above 0.6 [31, 32]. The good quality of the predicted models was substantiated with the graphical plot of normalized QMEAN4 score against the protein size revealing the comparison with non-redundant set of PDB structures. The comparison result relates the quality scores of the predicted model to the obtainable scores for the experimental structure of like size suggesting a normalized QMEAN4 score of a standard deviation of the mean z score (|Z-score < 1). Interestingly, the $3D^{refined}$ models of GCLs showed an increased in the quality of the protein via Ramachandran plot using PROCHECK from 87.7% to 89.8% for human and from 89.1% to 89.6% (Table 3). The statistical result of the Ramachandran plots of the HGCL and MGCL amino acid residues revealed that (503 residues) 89.8% and (492 residues) 89.6% respectively are found in the favored region (A, B, and L; Red color), (51 residues) 9.1% and (50 residues) 9.1% respectively are found in the additional allowed region (a, b, l and p; yellow color), (3 residues) 0.5% and (4 residues) 0.7% respectively are found in the generously allowed region (~a, ~b, ~l, and ~p; light green and cream colors) and (3 residues) 0.5% and (3 residues) 0.5% respectively are found in the disallowed region (white color) (Figure 6). This result suggested that the phi and psi backbone dihedral

angles in both predicted structures of human and mouse GCL models are reasonably accurate [33]. The amino acid residues in the disallowed region are Glu168, Glu228 and Glu545 for human and Asn495, Asp499 and Glu543 for mouse. Furthermore, none of the planar atoms of the models has RMS distances that are not within the best fit plane with no black bars which indicate that all the residues of the models showed least deviation from the planarity (Figure 7). Remarkably, some of the residues (Phe, Trp and Tyr) of MGCL are off the graph [16, 17, 34, 35]. Captivatingly, the verify 3D revealed 85.49% and 88.85% (greater than 80%) of respective HGCL and MGCL amino acid residues had averaged 3D-1D score >= 0.2 (Figure 8). This results suggested that the two models (HGCL and MGCL) had a valid protein structure [36, 37]. Similarly, the result of the binding site identification (COFACTOR) corresponds to the 3D swiss model structure prediction for HGCL and MGCL models where *Saccharomyces cerevisiae* (3ig5) was used as the preferred template due to its GMQE values. In addition, Table 4a depicted the top 10 structural aligned (TM-align) identified analogs in PDB through the TM-score where values close to 1 indicate closed aligned sequence with least RMSD (low level of deviation among the amino acid residues) and high IDEN value (percentage similarity of the sequence) suggesting a moderately and reasonable model with good binding prediction [38]. Although both models (HGCL and MGCL) showed closed similarity with 3ig5, comparing the two predicted refined models, MGCL showed better TM-align prediction using TM-score, RMSD, IDEN and cov as analysis parameters [38]. It is evident from Table 4b that the predicted models are reliable with top five known enzymes homolog in PDB where 3ig5 identified as the topmost known enzyme with the highest confidence score $Cscore^{EC}$ values (0.191 and 0.199 for HGCL and MGCL respectively) for the enzyme commission number prediction. Similarly, the obtained result of the binding site score (BS-score) prediction showed that both predicted models for different ligands as seen in the BS-score values which are approximately equal to 1 or above suggest a realistic local binding match between the predicted models and the templates (Table 4c) [38]. In this binding site prediction analysis, HGCL showed perfect local binding match to two templates (3lvvA) with BS-score values 1.62 and 1.50 and moderate local binding match to three templates: 2gwdA, 3o6xA and 2d32D with respective BS-score values 0.99, 0.90 and 0.86 while MGCL depicted absolute perfect local binding match to all the top four templates used with BS-score values greater than 1 in all the ligands such as glutamate (Glu), glutathione (GSH), adenosine diphosphate (ADP) and Magnesium (Mg). In almost similar pattern, the predicted gene ontology results via molecular function, biological processes and cellular part reveals accurate and reliable data for the predicted models with all confidence score for gene ontology ($Cscore^{GO}$) values greater 0.5 (Table 4d) [38].

Figure 1. The primary sequence of human glutamate-Cysteine ligase (HGCL) and mouse glutamate-Cysteine ligase (GCL).

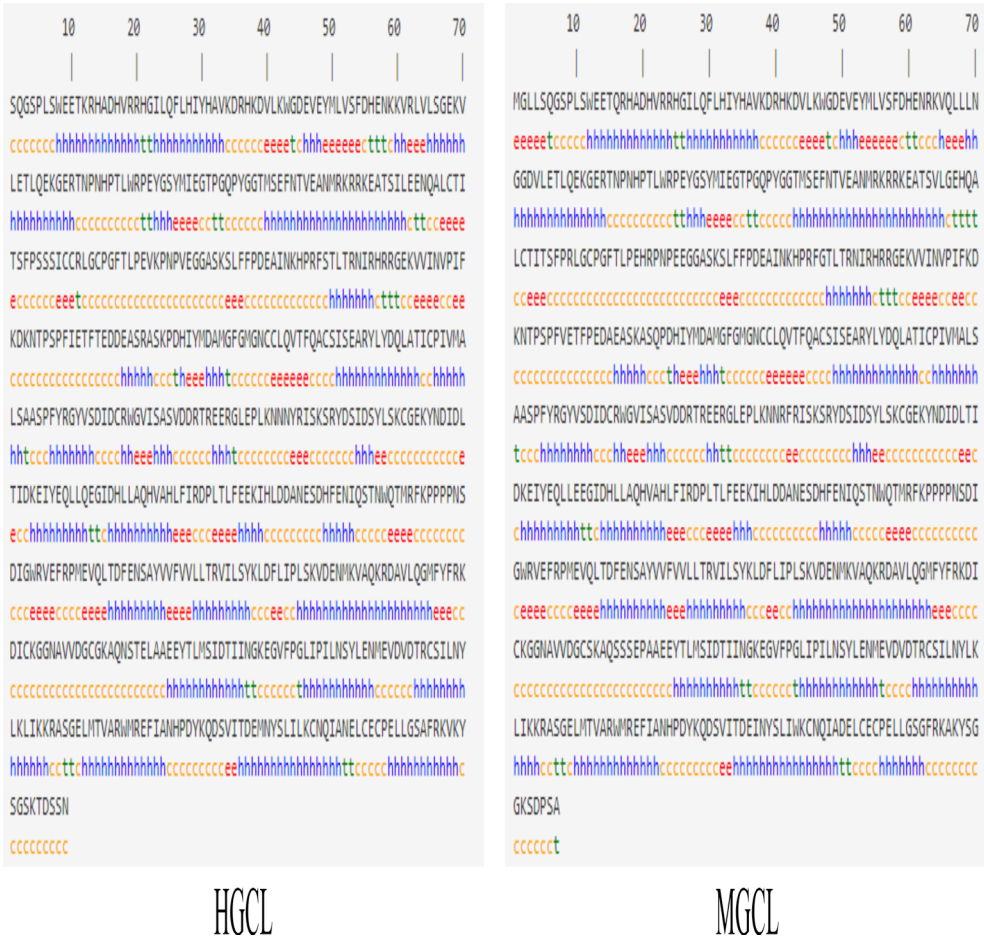


Figure 2. The SOPMA secondary sequence prediction of glutamate-cysteine ligase from human (HGCL), and mouse (MGCL).

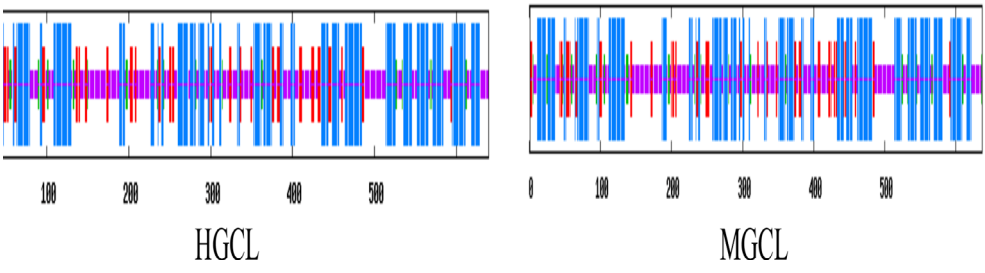


Figure 3. The SOPMA secondary structure types for glutamate-cysteine ligase from human (HGCL) and mouse (MGCL).

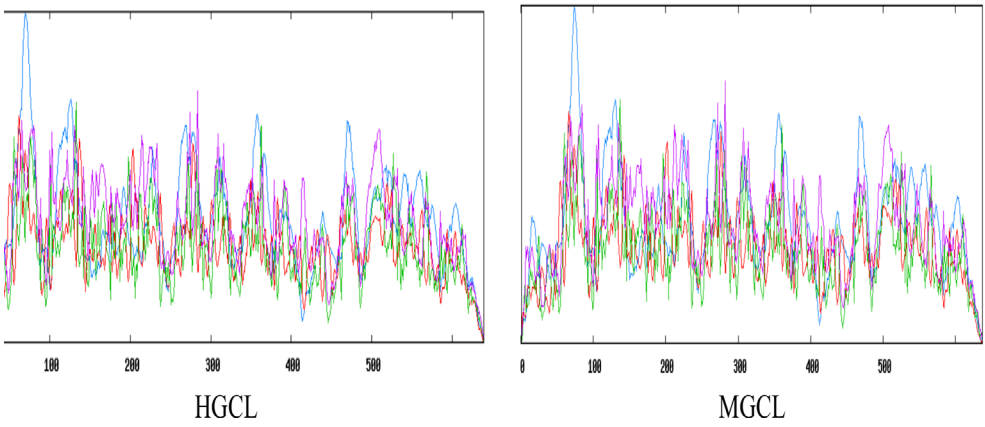


Figure 4. The SOPMA secondary structure states of glutamate-cysteine ligase from human (HGCL), and mouse (MGCL).

Table 1. The predicted SOPMA secondary structures of glutamate-cysteine ligase and sequence length from human and mouse.

Source	Human	Mouse
Sequence length	639	637
SOPMA Secondary Predicted Structure (%)		
Alpha helix (Hh)	(268) 41.94	(263) 41.29
3_{10} helix (Gg)	(0) 0.00	(0) 0.00
Pi helix (Ii)	(0) 0.00	(0) 0.00
Beta bridge (Bb)	(0) 0.00	(0) 0.00
Extended strand (Ee)	(83) 12.99	(81) 12.72
Beta turn (Tt)	(29) 4.54	(33) 5.18
Bend region (Ss)	(0) 0.00	(0) 0.00
Random coil (Cc)	(259) 40.53	(260) 40.82
Ambiguous state (?)	(0) 0.00	(0) 0.00
Other states	(0) 0.00	(0) 0.00
Other parameters		
Windows width	17	17
Similarity threshold	8	8
Number of states	4	4

Table 2. The predicted 3D crystal Swiss models of glutamate-cysteine ligase from human and mouse.

Organism sources	Human			Mouse		
No of Models built	Model 1	Model 2	Model 3	Model 1	Model 2	Model 3
QMEAN Z-Scores	-3.88	-4.64	-2.80	-3.72	-4.85	-2.41
QMEANDisco	0.73±0.05	0.20±0.12	0.24±0.12	0.75±0.05	0.28±0.12	0.24±0.12
GMQE	0.75	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00
Template	3ig5.1.A	2mfi.1.A	4r71.2.C	3ig5.1.A	2mfi.1.A	4r71.2.C
Sequence Similarity	0.41	0.28	0.30	0.42	0.27	0.29
Sequence Identity	44.76%	21.62%	23.33%	45.67%	19.44%	20.00%

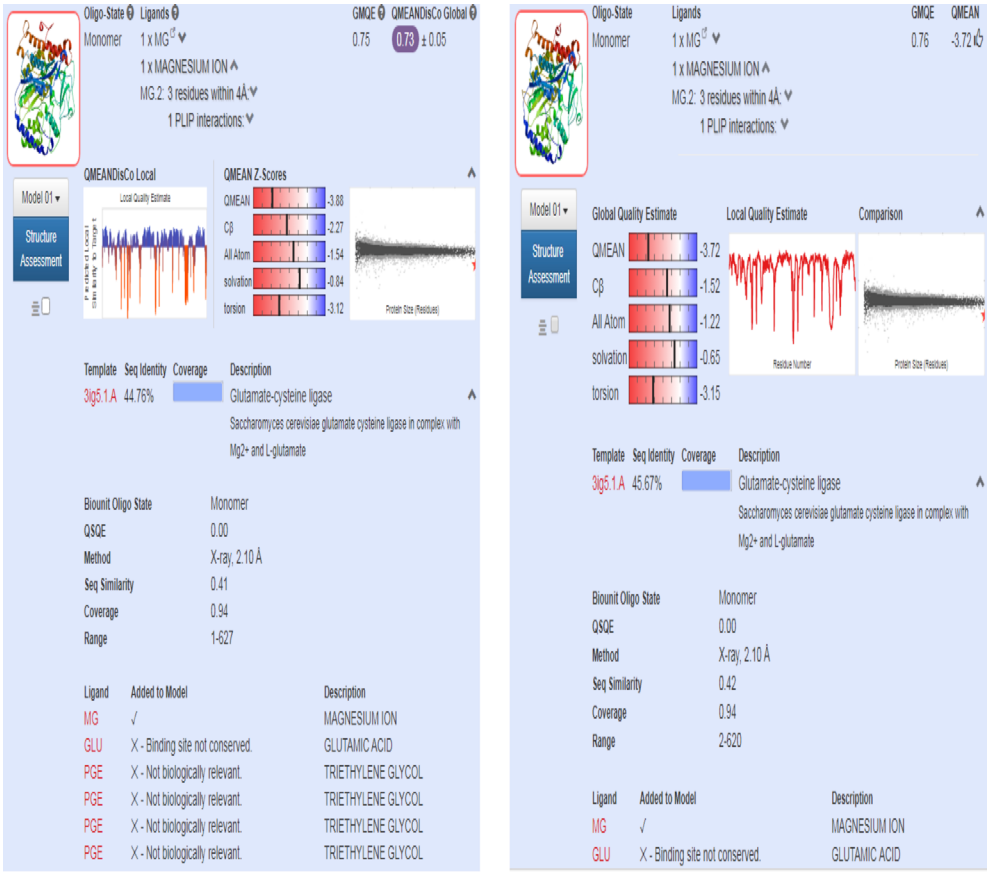


Figure 5. The refined swiss model 3D crystal structures of glutamate-cysteine ligase from human and mouse.

Table 3. The PROCHECK Ramachandran plots of the chosen refined Swiss model 3D crystal structures.

Organism source	Ramachandran plot for the Swiss model structures (%)	
	Initial Swiss structure	Refined Swiss structure
Human	87.7	89.8
Mouse	89.1	89.6

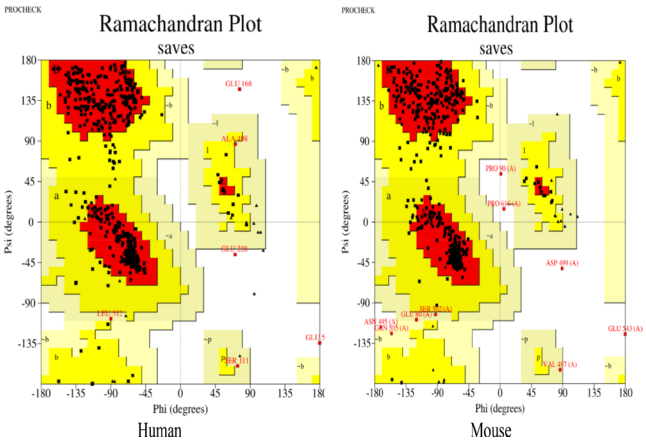


Figure 6. The PROCHECK Ramachandran plots of refined HGCL and MGCL models.

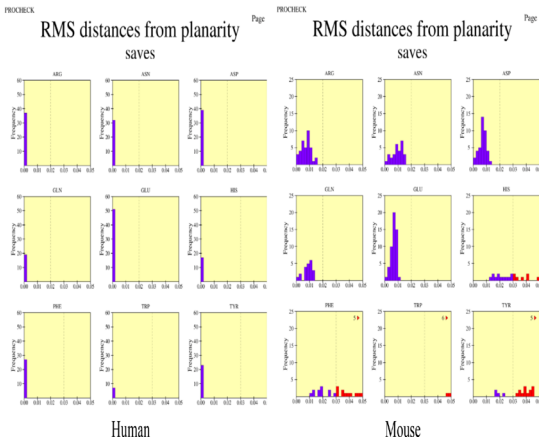


Figure 7. The PROCHECK RMS distances from planarity of HGCL, and MGCL models.

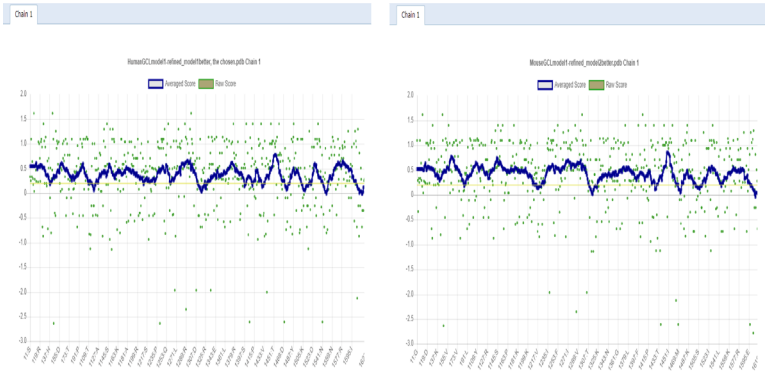


Figure 8. The PROCHECK verify 3D of HGCL and MGCL models.

Molecular docking study

To substantiate the homology modeling assessment of the predicted GCL 3D crystal structure models, the molecular docking done using naphthalene and its metabolites as ligands in reference to a known inhibitor (GSH). The binding scores, interacting residues were obtained as well as the type of non-covalent interactions between the respective ligand towards the GCL models are shown in Tables 5a and 5b, and Figures 9a and 9b. The molecular docking binding scores for all the ligands examined towards HGCL were all significantly different and showed better binding scores than GSH (binding score -5.20±0.00 kcal/mol). Although GSH interacted mostly with HGCL via conventional hydrogen bond compared to assessed ligands as proposed by Elokely and Doerksen [39], the high binding score could be due to other non-covalent interactions mostly pi-interaction orientations such as pi-pi stacked, pi-pi T-shaped and pi-sigma with residues like Phe210, Val292, Arg580, Ala584 (Table 5a and Figure 9a). All the assessed ligands interacted with HGCL in a different pocket compared to GSH which could be responsible for their significant better binding scores arose from different non-covalent interactions other than covalent hydrogen bond as seen in GSH. These pi-interactions, which are not affected by solvation/desolvation could contribute to the inhibition binding from the assessed ligands [40, 41]. Similarly, MGCL molecular docking binding scores followed almost the same pattern in which all the assessed ligands had better binding scores than GSH. Also, the interactions are mainly non-covalent interactions with no conventional hydrogen bond interaction among the ligands except 1,2-naphthoquinone (CID: 10667) where Lys46 hydrogen bond interaction was observed. Conversely, MGCL ligand binding occurred in two different pockets: pocket 1 with residues mainly Phe383, Lys386 and Asp396 while the main residues that interacted in pocket 2 are Lys46 and Pro109

Table 4a. TM-align identified top 10 structural analogs in PDB.

Rank	PDB Hit	HGCL				MGCL			
		TM-Score	RSMD[a]	IDEN[a]	Cov	TM-Score	RSMD[a]	IDEN[a]	Cov
1	3ig5A	0.94	1.18	0.438	0.957	0.96	1.12	0.450	0.966
2	2gwcF	0.55	3.14	0.135	0.608	0.56	3.10	0.132	0.616
3	2d33A	0.52	4.35	0.086	0.614	0.52	4.37	0.092	0.622
4	1r8gB	0.51	2.59	0.133	0.550	0.52	2.53	0.136	0.557
5	3nztA	0.51	4.13	0.090	0.601	0.52	4.19	0.086	0.611
6	3ln7A	0.49	4.01	0.094	0.571	0.49	3.97	0.090	0.577
7	3ln6A1	0.32	3.58	0.101	0.359	0.32	3.58	0.100	0.363
8	4jzaA	0.30	8.27	0.041	0.502	0.30	8.22	0.025	0.512
9	3lmmD	0.23	7.88	0.036	0.368	0.24	7.55	0.050	0.373
10	3g7rB	0.20	5.32	0.080	0.258	0.20	5.29	0.081	0.262

(a) Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library. (b) RMSD[a] is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align. (c) IDEN[a] is the percentage sequence identity in the structurally aligned region. (d) Cov. represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Table 4b. Top 5 enzyme homologs in PDB.

Rank	HGCL					MGCL				
	PDB Hit	Cscore[EC]	TM-Score	RSMD[a]	IDEN[a]	PDB Hit	Cscore[EC]	TM-Score	RSMD[a]	IDEN[a]
1	3ig5A	0.191	0.944	1.18	0.438	3ig5A	0.199	0.958	1.12	0.450
2	2gwdA	0.083	0.569	3.20	0.131	2gwdA	0.090	0.577	3.18	0.128
3	2d33A	0.066	0.517	4.35	0.086	3nztA	0.066	0.518	4.19	0.086
4	1pj6A	0.060	0.322	8.32	0.051	2d33A	0.066	0.523	4.37	0.092
5	1b0pA	0.060	0.341	8.24	0.050	1pj6A	0.060	0.326	7.59	0.034

(a) Cscore[EC] is the confidence score for the Enzyme Commission (EC) number prediction with values ranging between [0-1]; where a higher score indicates a more reliable EC number prediction. (b) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein. (c) RMSD[a] is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align. (d) IDEN[a] is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

Table 4c. Template proteins with similar binding site.

Rank	HGCL					MGCL				
	PDB Hit	$Cscore^{LB}$	TM-Score	BS-score	Ligand Name	PDB Hit	$Cscore^{LB}$	TM-Score	BS-score	Ligand Name
1	3lvvA	0.44	0.946	1.62	LBP	3ig5A	0.49	0.959	1.61	Glu
2	3lvvA	0.28	0.946	1.50	ADP	3lvwA	0.32	0.959	1.67	GSH
3	2gwdA	0.10	0.569	0.99	Glu	3ig8A	0.29	0.959	1.49	ADP
4	3o6xA	0.02	0.391	0.90	Mg	3o6xA	0.04	0.395	1.07	Mg
5	2d32D	0.02	0.513	0.86	Cys					

(a) $Cscore^{LB}$ is the confidence score of predicted binding site with values ranging between [0-1]; where a higher score indicates a more reliable ligand-binding site prediction. (b) BS-score is a measure of local similarity (sequence & structure) between template binding site and predicted binding site in the query structure. Based on large scale benchmarking analysis, we have observed that a BS-score >1 reflects a significant local match between the predicted and template binding site. (c) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein.

Table 4d. Predicted gene ontology for the refined GCL models via molecular function, biological process and cellular components.

Cofactor parameters	HGCL			MGCL		
	GO term	$Cscore^{GO}$	Name	GO term	$Cscore^{GO}$	Name
Molecular Function	GO: 0004357	1.00	GCL activity	GO: 0004357	1.00	GCL activity
Biological Process	GO: 0006750	1.00	glutathione biosynthetic process	GO: 0006750	1.00	glutathione biosynthetic process
	GO: 0044699	0.55	Single-organism process	GO: 0044699	0.51	Single-organism process
Cellular Component	GO: 0044424	1.00	Intracellular part	GO: 0044424	1.00	Intracellular part
	GO: 0044444	0.95	Cytoplasmic part	GO: 0044444	0.94	Cytoplasmic part
	GO: 0043234	0.91	Protein complex	GO: 0017109	0.90	GCL complex
	GO: 0017109	0.90	GCL complex			

Table 5a. Molecular docking binding scores of naphthalene and its metabolites towards HGCL and the non-covalent interacting residues.

Parameters / Ligand CID	Binding score (kcal/mol)	HGCL non-covalent interacting residues									
		Conventional H- bond	Alkyl	Amide - Pi Stacked	C-H bond	Pi - Alkyl	Pi-Donor H-bond	Pi - Pi Stacked	Pi - Sigma	Pi-Pi T-Shaped	Unfavorable Donor-Donor
931	-6.07±0.12^{bc}					Pro86, Met110				Tyr106	
6849	-6.20±0.00^{ab}					Val292, Arg580		Phe210	Ala584		
7002	-6.27±0.06^{a}		Phe210, Arg580	Ile583		Val292, Arg580, Ala584		Phe210	Ala584		
8530	-6.00±0.00^{cd}	Thr436						Phe438	Leu563		
10667	-6.17±0.12^{abc}	Pro86, Asn119				Pro86	Glu104	Tyr106			
108063	-5.83±0.21^{d}		Pro86, Tyr106		Asn114	Met110					
124886	-5.20±0.00^{e}	Glu92, Glu99, Arg187, Asn402, Ser405, Arg429			Ser405						Arg187

Table 5b. Molecular docking binding scores of naphthalene and its metabolites towards MGCL and the non-covalent interacting residues.

Parameters / Ligand CID	Binding score (Kcal/mol)	MGCL non-covalent interacting residues						
		Conventional H- bond	C-H bond	Pi-Alkyl	Pi-Anion	Pi-Cation	Pi-Sigma	Pi-Pi T-Shaped
931	-5.80±0.00[bc]			Phe383	Asp396	Lys386		Phe383
6849	-6.27±0.06[ab]			Phe383		Lys386		Phe383
7002	-6.07±0.12[bc]			Phe383	Asp396	Lys386		Phe383
8530	-6.33±0.12[ab]		Thr253	Lys46, Pro109, Arg423			Pro109	
10667	-6.67±0.15[a]	Lys46	Trp47				Pro109	
108063	-5.90±0.10[bc]			Phe383	Asp396	Lys386		Phe383
124886	-5.67±0.72[c]	Lys46, Asp49, Thr253	Gly48, Thr253					

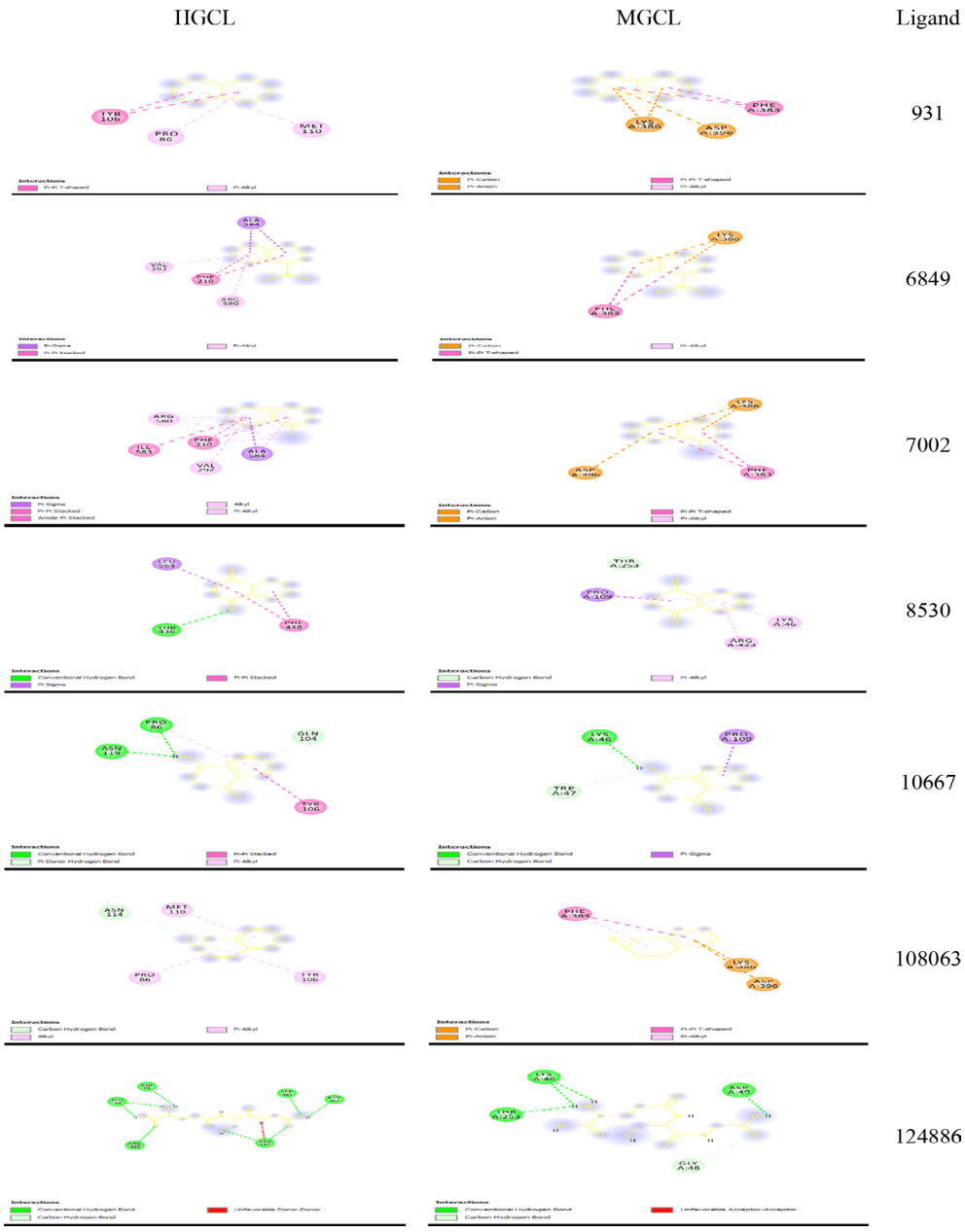


Figure 9a. 2D molecular binding structures of HGCL, and MGCL with 931 (naphthalene), 6849 (1-nitronaphthalene), 7002 (1-methynaphthalene), 8530 (1,4-naphthoquinone), 10667 (1,2-naphthoquinone), 108063 (naphthalene epoxide), and 124886 (glutathione).

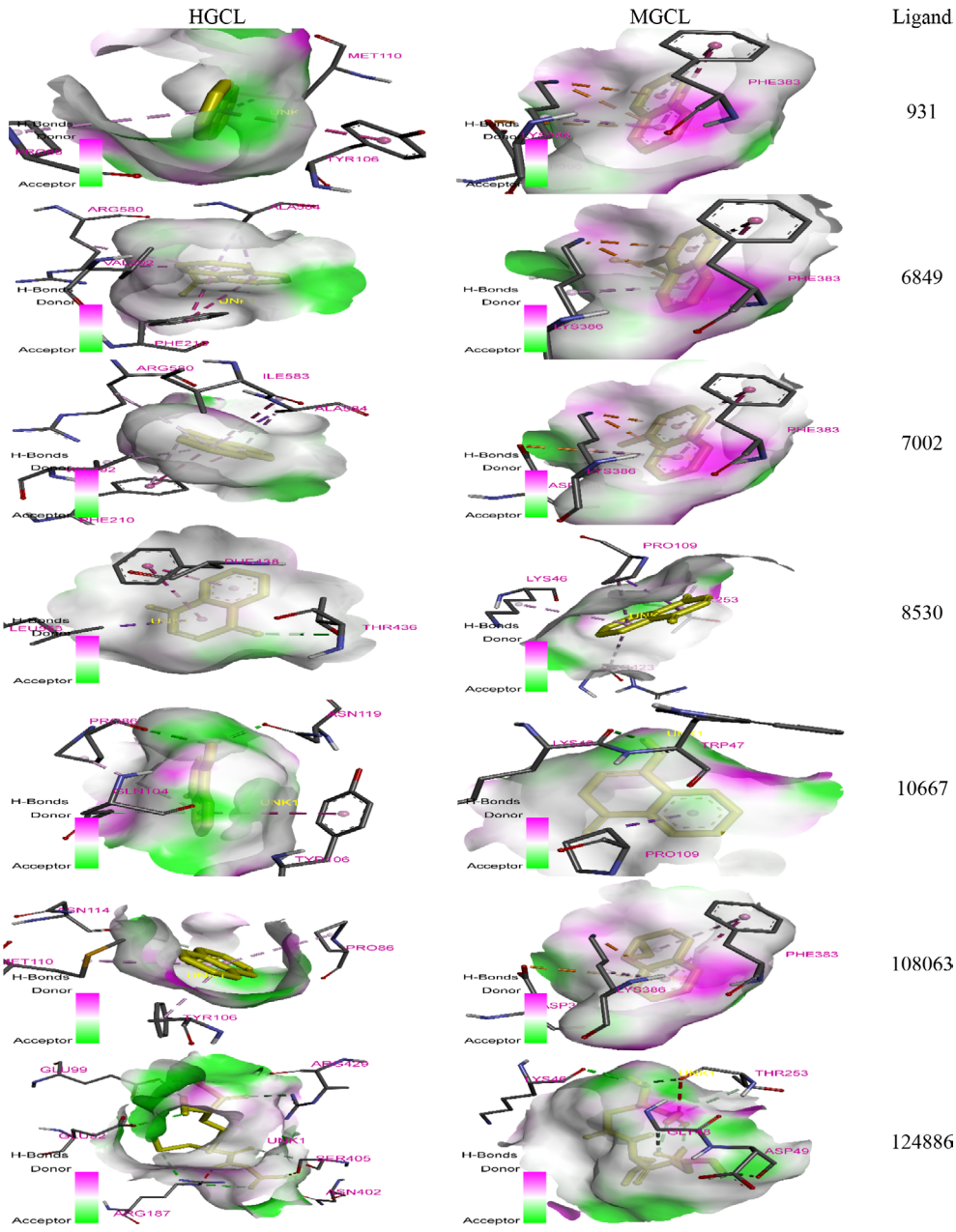


Figure 9b. 3D molecular binding structures of HGCL, and MGCL with 931 (naphthalene), 6849 (1-nitronaphthalene), 7002 (1-methynaphthalene), 8530 (1,4-naphthoquinone), 10667 (1,2-naphthoquinone), 108063 (naphthalene epoxide), and 124886 (glutathione).

Conclusion

Considering the fact that GCL is essential in the de novo synthesis of GSH, the assessment of HGCL and MGCL provides considerable catalytic mechanism and suggests approaches through which inhibitors with higher binding affinity may be attained the proposed revealed binding sites could be preserved. To the best of our knowledge, the study has revealed different binding pockets for the two models that could influence the physico-chemical properties of ligand binding interactions with the enzyme needed for effective *in silico* GCL inhibitor designing.

Acknowledgements

The support provided by the staff of Department Biochemistry, College of Natural and Applied Sciences, McPherson University, Seriki Sotayo, Ogun State, Nigeria is well appreciated.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. C. Espinosa-Diez, V. Miguel, D. Mennerich, T. Kietzmann, P. Sanchez-Perez, S. Cadenas, S. Lamas, Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress, *Redox Biol.*, **6**, 183-197 (2015).

2. T.P. Dalton, Y. Chen, S.N. Schneider, D.W. Nebert, H.G. Shertzer, Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 1511-1526 (2004).

3. D. Morris, J. Ly, P.-T. Chi, J. Daliva, T. Nguyen, C. Soofer, Y.C. Chen, M. Lagman, V. Venketaraman, Glutathione synthesis is compromised in erythrocytes from individuals with HIV, *Front. Pharmacol.*, **5**, 73 (2014).

4. Y. Yang, M.Z. Dieter, Y. Chen, H.G. Shertzer, D.W. Nebert, T.P. Dalton, Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response, *J. Biol. Chem.*, **277**, 49446-49452 (2002).

5. C.C. Franklin, D.S. Backos, I. Mohar, C.C. White, H.J. Forman, T.J. Kavanagh, Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase, *Mol. Aspects Med.*, **30**, 86-98 (2009).

6. N. Fu, D. Li, W. Li, W. Zhao, S. Zhang, L. Liu, S. Zhao, J. Du, L. Kong, R. Wang, Y. Zhang, Y. Nan, Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit attenuated hepatitis C virus-related liver fibrosis and suppressed endoplasmic reticulum stress, *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 199 (2020).

7. Y. Xiong, Y. Xiong, Y. Wang, Z. Wang, A. Zhang, N. Zhao, D. Zhao, Z. Yu, Z. Wang, J. Yi, X. Luan, Inhibition of glutathione synthesis via decreased glucose metabolism in stored RBCs, *Cell. Physiol. Biochem.*, **51**, 2172-2184 (2018).

8. Y. Kumagai, Y. Abiko, Environmental electrophiles: Protein adducts, modulation of redox signaling, and interaction with persulfides/polysulfides, *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 203-219 (2017).

9. R.M. Baldwin, W.T. Jewell, M.V. Fanucchi, C.G. Plopper, A.R. Buckpitt, Comparison of pulmonary/nasal CYP2F expression levels in rodents and rhesus macaque, *J. Pharmacol. Exp. Therapy*, **309**, 127-136 (2004).

10. The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research* **49** (D1) (2021) D480-D489. URL: https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100

11. C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, G. Deléage NPS@: Network protein sequence analysis, *Trends Biochem. Sci.*, **25**(3), 147-150 (2000).

12. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, FT. Heer, TAP. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**(W1), W296-W303 (2018).

13. D. Bhattacharya, J. Cheng, 3Drefine: Consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic level energy minimization, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **81**(1), 119-131 (2012).

14. D. Bhattacharya, J. Cheng, i3Drefine software for protein 3D structure refinement and its assessment in CASP10, *PLoS One*, **8**(7), e69648 (2013).

15. D. Bhattacharya, J. Nowotny, R. Cao, J. Cheng, 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement, *Nucleic Acids Res.*, **44**(W1), W406-W409 (2016). doi: 10.1093/nar/gkw336.

16. R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystal.*, **26**(2), 283-291 (1993).

17. R.A. Laskowski, J.A. Rullmannn, M.W. MacArthur, R. Kaptein, J.M. Thornton, AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J. Biomol. NMR*, **8**(4), 477-486 (1996).

18. P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, *Bioinformatics*, **27**(3), 343-350 (2011) 343-350.

19. A. Roy, J. Yang, Y. Zhang, COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation, *Nucleic Acids Res.*, **40**(W1), W471-W477 (2012).

20. S. Kim, J. Chen, T. Cheng, A. Gindulyte, J. He, S. He, Q. Li, B.A. Shoemaker, P.A. Thiessen, B. Yu, L. Zaslavsky, J. Zhang, E.E. Bolton, PubChem 2019 update: improved access to chemical data, *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), D1102–D1109 (2019).

21. N.M. O'Boyle, M. Banck, C.A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, GR. Hutchison, Open Babel: An Open chemical toolbox, *J. Cheminformatics*, **3**(10), 33 (2011).

22. O. Trott, AJ. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455-461 (2010).

23. A. Meister, Glutathione metabolism and its selective modification, *J. Biol. Chem.*, **263**(33), 17205-17208 (1988).

24. G.F. Seelig, R.P. Simondsen, A. Meister, Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9345-9347 (1984).

25. Y. Chen, H.G. Shertzer, S.N. Schneider, D.W. Nebert, T.P. Dalton, Glutamate cysteine ligase catalysis: Dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels, *J. Biol. Chem.*, **280** 33766-33774 (2005).

26. CS. Huang, ME. Anderson, A. Meister, Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase, *J. Biol. Chem.*, **268**, 20578-20583 (1993).

27. JM. Mason and KM. Arndt, Coiled coil domains: stability, specificity and biological implications, *ChemBioChem*, **5**(2), 170-176 (2004).

28. C. Geourjon, G. Deléage, SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments, *Bioinformatics*, **11**(6), 681-684 (1995).

29. JM. Cardoso, L. Fonseca, C. Egas, I. Abrantes, Cysteine proteases secreted by the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus: in silico analysis, *Comput. Biol. Chem.*, **77,** 291-296 (2018).

30. B. Patel, V. Singh, D. Patel, Structural bioinformatics, in: N.A. Shaik, K.R. Hakeem, B. Banaganapalli, R. Elango (editors), *Essentials of Bioinformatics*, vol. I., Springer, Cham, Switzerland, 2019, pp. 169-199.

31. O.G. Oduselu, O.O. Ajani, U.Y. Ajamma1, B. Brors, E. Adebiyi, Homology modelling and molecular docking studies of selected substituted benzo[d]imidazol-1-yl)methyl) benzimidamide scaffolds on *Plasmodium falciparum* adenylosuccinate lyase receptor, *Bioinform. Biol. Insights*, **13,** 1177932219865533 (2019).

32. A.O. Roland, A.E. Morayo, O. Joan, F.I. Gbadamosi, E. Kayode, M. Adelabu, Modelling profile of onchocerca volvulus glutamate-cysteine ligase (ONCVO-GCL), *J. Anal. Pharm. Res.*, **10**(3), 118-122 (2021).

33. H. Yamaguchi, T. Akitaya, Y. Kidachi, K. Kamiie and H. Umetsu, Homology modeling and structural analysis of human γ-glutamylcysteine ligase catalytic subunit for antitumor drug development, *J. Biophys. Chem.*, **3**(3), 238-248 (2012)

34. A.L. Morris, M.W. MacArthur, E.G. Hutchinson, J.M. Thornton, Stereochemical quality of protein structure coordinates, *Proteins*, **12**, 345-364 (1992).

35. RA. Laskowski, MW. MacArthur, JM. Thornton, PROCHECK: validation of protein structure coordinates, in: M.G. Rossmann, E. Arnold (editors), *International Tables of Crystallography, Volume F. Crystallography of Biological Macromolecules*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2001, pp. 722-725.

36. R. Lüthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure, *Science*, **253**(5016), 164-170 (1991).

37. R. Lüthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, Assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Nature* **356**(6364), 83-85 (1992).

38. C. Zhang, P.L. Freddolino, Y. Zhang, COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information, *Nucleic Acids Res.*, **45** (Web Server issue) W291-W299 (2017).

39. K.M. Elokely, R.J. Doerkse, Docking challenge: protein sampling and molecular docking performance, *J. Chem. Inform. Model.*, **53**(8), 1934-1945 (2013).

40. M.J.A. Bernaldez, J.B. Billones, A. Magpantay, In silico analysis of binding interactions between GSK983 and Human DHODH through docking and molecular dynamics, *AIP Conference Proceedings*, **2045**, 020073 (2018).

41. I. Olaoye, B. Oso, A. Aberuagba, Molecular mechanisms of anti-inflammatory activities of the extracts of *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris*, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **13**(4), 207-216 (2021).

How to cite this article

I. Olaoye, B. Oso, A. Aberuagba, Molecular insights into the binding mechanisms of human and mouse Glutamate-cysteine ligases, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(1), 311-336 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109381

Artigo de revisão / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102283*

A segurança da farmacoterapia em pacientes oncológicos pediátricos: uma revisão de literatura

Alison Lucas Barboza[1a], Anna Paula de Castro Teixeira[2b], Camila de Albuquerque Montenegro[1c], Maria Emília da Silva Menezes[1d], Fernando de Sousa Oliveira[1e*]

[1] Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil.

[2] Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Correios eletrônicos:

[a] alisonlucas.al@gmail.com

[b] annapaula.1993@gmail.com

[c] camontenegro2502@gmail.com

[d] memenezes_2@yahoo.com.br

[e] fernandoufcg@hotmail.com

Recebido: 4 de maio de 2022

Revisado: 8 de janeiro de 2023

Aceto: 15 de janeiro de 2023

Resumo

Introdução: o câncer do tipo infantil é raro, mas quando comparado aos dos adultos, vem apresentando um perfil crescente de incidência, o que requer uma assistência de qualidade pelo sistema de saúde, considerando as diferenças fisiológicas nas variadas faixas etárias pediátricas. Os estudos de utilização e segurança de medicamentos em crianças são de extrema importância, a fim de promover uma racionalidade farmacoterapêutica, conduzindo a um tratamento seguro e efetivo. **Objetivo:** revisar os aspectos que interferem na segurança do tratamento farmacológico em pacientes oncológicos pediátricos. **Metodologia:** foi realizada uma revisão integrativa da literatura por meio das bases de dados: SciELO, Bireme, PubMed, Portal CAPES e LILACS, analisando os trabalhos publicados nos últimos 10 anos (2011-2021). **Resultados:** foram encontrados 89 artigos, dos quais 46 compuseram o presente trabalho. Estudos na população pediátrica são escassos e, consequentemente, o arsenal terapêutico para essa população também diminui, acarretando poucas alter-

nativas terapêuticas para tratamento do câncer infantil. **Conclusões:** as estratégias terapêuticas antineoplásicas apelam para medicamentos que ainda não foram totalmente aprovados pelas agências reguladoras nacionais e/ou internacionais. Sendo assim, é essencial a atuação do farmacêutico clínico para apresentar propostas de segurança, monitorar e sugerir estratégias de uso de medicamentos antineoplásicos na população infantil.

Palavras-chaves: Assistência farmacêutica, oncologia, segurança do paciente pediátrico, farmácia clínica.

Resumen

La seguridad de la farmacoterapia en pacientes oncológicos pediátricos: una revisión de la literatura

Introducción: el cáncer infantil es raro, pero en comparación con los adultos ha mostrado un perfil de incidencia creciente, lo que requiere una atención de calidad por parte del sistema de salud, considerando las diferencias fisiológicas en los diferentes grupos de edad pediátrica. Los estudios sobre el uso y la seguridad de los medicamentos en niños son de suma importancia para promover la racionalidad farmacoterapéutica, que conduzca a un tratamiento seguro y eficaz. **Objetivo:** revisar los aspectos que interfieren en la seguridad del tratamiento farmacológico en pacientes oncológicos pediátricos. **Metodología:** se realizó una revisión integrativa de la literatura a través de las siguientes bases de datos: SciELO, Bireme, PubMed, Portal CAPES y LILACS, analizando los trabajos publicados en los últimos 10 años (2011-2021). **Resultados:** se encontraron 89 artículos, de los cuales 46 componen el presente trabajo. Los estudios en población pediátrica son escasos y, en consecuencia, el arsenal terapéutico para esta población también disminuye, resultando en pocas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer infantil. **Conclusiones:** las estrategias terapéuticas antineoplásicas apelan a fármacos que aún no han sido aprobados en su totalidad por las agencias reguladoras nacionales o internacionales. Por lo tanto, el papel del farmacéutico clínico es fundamental para presentar propuestas de seguridad, monitorear y sugerir estrategias para el uso de medicamentos contra el cáncer en la población infantil.

Palabras clave: Atención farmacéutica, oncología, seguridad del paciente pediátrico, farmacia clínica.

Summary

Safety of pharmacotherapy in pediatric cancer patients: a literature review

Introduction: childhood cancer is rare, but when compared to adults, it has shown an increasing incidence profile, which requires quality care by the health system, considering the physiological differences in the different pediatric age groups. Studies on the use and safety of medicines in children are extremely important in order to promote pharmacotherapeutic rationality, leading to a safe and effective treatment. **Objective:** to review the aspects that interfere with the safety of pharmacological treatment in pediatric cancer patients. **Methodology:** an integrative literature review was carried out through the following databases: SciELO, Bireme, PubMed, Portal CAPES and LILACS, analyzing the works published in the last 10 years (2011-2021). **Results:** 89 articles were found, of which 46 composed the present work. Studies in the pediatric population are scarce and, consequently, the therapeutic arsenal for this population also decreases, resulting in few therapeutic alternatives for the treatment of childhood cancer. **Conclusions:** antineoplastic therapeutic strategies appeal to drugs that have not yet been fully approved by national and/or international regulatory agencies. Therefore, the role of the clinical pharmacist is essential to present safety proposals, monitor and suggest strategies for the use of anticancer drugs in the child population.

Keywords: Pharmaceutical assistance, pediatric oncology, pediatric patient safety, clinical pharmacy.

Introdução

Quando utilizado de forma correta, os medicamentos têm importante papel na saúde pública, sendo responsáveis pela melhora da qualidade de vida da população, amenizando o quadro sintomatológico, impedindo e prevenindo a progressão de doenças. No entanto, os medicamentos podem desencadear reações adversas, causando danos ao organismo. O farmacêutico tem um papel crucial na orientação e intervenção educativa dos pacientes, monitorando as reações adversas, informando sobre os perigos da automedicação e administração excessiva de medicamentos, além de registrar as notificações, fortalecendo a farmacovigilância no sistema de saúde [1].

O termo Segurança do Paciente envolve, em geral, a prevenção de erros no cuidado e a eliminação de danos causados aos pacientes. Conceitualmente, o erro no cuidado em saúde resulta de ação não intencional, causada por algum problema ou falha, durante a realização da assistência ao paciente. Nesse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu o 'erro de medicação' como evento evitável que, de fato ou potencialmente, pode levar ao uso inadequado de medicamento, que, por sua vez, poderia lesar ou não o paciente [2].

Os medicamentos administrados erroneamente podem afetar os pacientes, e dentre as consequências estão prejuízos/danos, reações adversas, lesões temporárias, permanentes e até a morte do paciente, sendo essa a terceira maior causa de morte nos Estados Unidos, requerendo maior atenção. Adicionalmente, dependendo da gravidade da ocorrência pode acarretar na prorrogação do internamento [3].

Nesse panorama, o câncer pediátrico e o seu tratamento surgem como uma preocupação em saúde e o seu desenvolvimento possui causas variadas, relacionadas aos fatores ambientais, hábitos de vida, pré-disposição genética ou malformações congênitas que favorecem o surgimento do câncer, visto que o organismo ainda não possui capacidade eficiente em se defender [4].

Em conjunto com a equipe multiprofissional de terapia antineoplásica, a participação ativa do farmacêutico garante a segurança assistencial ao paciente oncológico, que exige muito cuidado, pois muitos fatores influenciam a adesão ao tratamento, tais como: idade, etnia, educação e fatores sociodemográficos. Como exemplo, podemos citar o fato de nem todas as crianças conseguirem ingerir comprimidos ou cápsulas, necessitando de um manejo diferencial direcionado a esses pacientes oncológicos. O farmacêutico possui papéis nas atividades clínicas e assistenciais, educação e orientação dos pacientes e familiares, logística, preparo da medicação, dispensação, monitoração e identificação dos riscos, assegurando a efetividade farmacoterapêutica [5].

Dessa forma, a realização de estudo sobre a segurança no uso de medicamentos na oncologia pediátrica, torna-se de grande importância, buscando a integridade dos pacientes e evitando as consequências negativas, visando sempre a melhoria da qualidade de vida vinculada a uma boa adesão ao tratamento medicamentoso. Diante disso, objetivo do estudo foi revisar os aspectos que interferem na segurança do tratamento farmacológico em pacientes oncológicos pediátricos.

Material e métodos

A revisão integrativa da literatura (RIL) é um dos métodos de pesquisa realizados na prática baseada em evidências, na qual é fundamentada por conhecimento científico, com resultados de qualidade, que requer a formulação de uma problemática, pesquisa literária, avaliação, análise e apresentação de dados, reunindo e sintetizando os resultados de forma sistemática e ordenada, contribuindo para o aprofundando do tema proposto [6].

A RIL é composta por seis etapas, na qual a primeira é caracterizada pela identificação do tema e elaboração da pergunta norteadora. Na segunda etapa, estabelece-se os critérios de inclusão e exclusão para a pesquisa de trabalhos publicados. Em seguida, a terceira etapa é a seleção dos artigos, que posteriormente analisados de forma crítica, constituindo a quarta etapa. Após a análise, os trabalhos são interpretados, sendo essa a quinta fase da RIL. Ao final, na sexta etapa, elabora-se a síntese de conhecimento adquirido (tabela 1), com a apresentação da RIL [7].

Tabela 1. Etapas de elaboração de revisão integrativa de literatura científica.

1º. Elaboração da pergunta norteadora
2º. Seleção dos trabalhos com base nos critérios estabelecidos
3º. Seleção dos artigos
4º. Leitura e análise crítica dos artigos selecionados
5º. Interpretação dos resultados dos artigos
6º. Elaboração da síntese do conhecimento adquirido com os trabalhos

Com o fundamento no conceito de RIL e no conhecimento de suas etapas, a problemática dessa pesquisa foi: Quais os fatores e intervenções necessárias para a prevenção de erros e otimização na segurança da farmacoterapia de pacientes oncológicos pediátricos? Após definir o problema de pesquisa, a busca virtual ocorreu por meio das bases de dados: *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e periódicos CAPES. Os critérios de inclusão foram: artigos disponíveis em rede na íntegra, em periódicos nacionais e internacionais, compreendendo artigos em inglês e português. Foi utilizada as seguintes palavras-chaves e suas combinações: "atenção farmacêutica", "oncologia", "câncer", "segurança do paciente" e "pediatria" e seus termos em inglês. Foram incluídos trabalhos publicados nos últimos 10 anos (2011-2021). Um total de 89 artigos foram encontrados e analisados, dos quais 46 foram necessários para compor o presente estudo. Foram excluídos artigos repetidos, trabalhos que não respondem à questão de pesquisa ou fora do período delimitado.

Desenvolvimento

Segurança do paciente

A segurança do paciente tem sido um tema discutido mundialmente nas últimas décadas, tornando-se elemento essencial para a melhoria da qualidade dos serviços de saúde. A discussão da temática foi fortalecida em 1999, a partir da publicação do Instituto de Medicina (IOM) dos Estados Unidos da América, intitulada "Errar é Humano" (*To Err is Human*), em que aponta o problema dos danos causados pela assistência à saúde em pacientes norte-americanos [8].

Nesse momento, surgiram iniciativas de diversas instituições do mundo inteiro na busca pela prevenção de eventos adversos e aplicações de estratégias que favoreçam a segurança do paciente no ambiente hospitalar [9]. No final do século passado, *Avedis Donabedian* estabeleceu como sete os atributos dos cuidados de saúde que definem a sua qualidade: eficácia, efetividade, eficiência, otimização, aceitabilidade, legitimidade e equidade. No início deste século, o IOM dos Estados Unidos da América passou a incorporar "segurança do paciente" como um dos seis atributos da qualidade, com a efetividade, a centralidade do paciente, a oportunidade do cuidado, a eficiência e a equidade [10].

A Portaria Ministerial 529/2013 instituiu o Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP) com objetivo de contribuir para a qualificação do cuidado em todos os estabelecimentos de saúde do território nacional. Regulamentada pela resolução da diretoria colegiada (RDC) 36/2013, ela institui as condutas para a segurança do paciente em serviços de saúde e possui foco em promoção de ações voltadas à segurança do paciente em âmbito hospitalar [11].

O plano de Segurança do Paciente (PSP) compõe um conjunto de práticas desenvolvidas por uma equipe multiprofissional, com comunicação efetiva, a fim de minimizar os riscos, priorizando a qualidade e segurança dos serviços, por meio da orientação e reorganização de práticas de monitoramento e inúmeros componentes envolvidos para vencer os desafios e desenvolver medidas de segurança para um cuidado seguro e eficaz [12].

Os aspectos multidimensionais como crença e práticas dos membros da organização, configuração do relacionamento e aprendizado com os erros, estilo de gestão e compromisso com a instituição, estão envolvidos com a segurança do paciente, de forma que a comunicação efetiva, o trabalho multidisciplinar, as boas condições de trabalho e suporte de liderança contribuem para a organização, as medidas preventivas e a eliminação da abordagem punitiva dos erros [13].

Segurança no uso de medicamentos

Com a introdução do PNSP pelo Ministério da Saúde, notou-se um grande avanço em termos de política pública, no sentido em que reconhece a magnitude dos eventos adversos no país e fomenta a ampliação do conhecimento sobre a temática. Uma das metas estabelecidas pelo PNSP tem como foco as ocorrências de eventos no processo de terapia medicamentosa, sendo publicado o "*Protocolo de segurança na prescrição, no uso e na administração de medicamentos",* documento norteador para a promoção de práticas seguras no uso de medicamentos em estabelecimentos de saúde no país [14].

Os erros decorrentes da terapia medicamentosa constituem um dos tipos de incidentes mais comuns nas instituições de saúde e são provocados, em grande parte, por falhas nos processos e procedimentos durante o cuidado. São passíveis de ocorrer em todas as etapas da terapia medicamentosa: prescrição, dispensação, preparação, administração e monitoramento, e podem resultar em danos graves e até na morte do paciente. Acredita-se que conhecer os riscos capazes de elevar o potencial para ocorrência de erros seja elemento essencial no gerenciamento e implementação de ações de segurança do paciente [15, 16].

Diante deste cenário, no ano de 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou o terceiro "Desafio Global para a Segurança do Paciente", intitulado "*Medicação sem Dano*", cuja meta a ser alcançada foi a redução, em 50%, de danos graves evitáveis relacionados a medicamentos, nos próximos cinco anos [16].

Segurança no uso de medicamentos em pediatria

Os medicamentos têm papel relevante na prevenção, manutenção e recuperação da saúde e contribuem para a melhoria da qualidade e da expectativa de vida da população. No entanto, apesar dos seus benefícios a prescrição e a utilização impróprias de medicamentos constituem uma das principais causas de complicações à saúde e de prejuízos econômicos e sociais [17].

Os medicamentos utilizados em pediatria não estão incluídos nas pesquisas científicas, são baseados na extrapolação e adaptação do uso em adultos, não são diretamente estudados, regulamentados e analisados, de acordo com os testes de eficácia e segurança para pacientes infantis. Sendo assim, não possuem uma política regulatória exclusiva acerca do registro e prescrição de medicamentos para crianças, existindo um risco potencial na utilização, por ignorar as diferenças fisiológicas existentes [18].

Como consequência, identifica-se a necessidade da administração de doses muito fracionadas de medicamentos, o que acarreta maior demanda de tempo de trabalho de enfermagem, além de manipulação excessiva das soluções, o que pode comprometer a

qualidade do procedimento em vários aspectos, como quanto à estabilidade e possibilidade de contaminação. Além dessas dificuldades, ressalta-se a possibilidade de intoxicação do paciente pediátrico em decorrência do uso de medicamentos comercializados em altas concentrações [19].

Apesar da lei do exercício profissional preconizar que práticas mais complexas sejam executadas por enfermeiros, no cotidiano da assistência observa-se que as instituições de saúde conferem a enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem, as mesmas atribuições na terapia medicamentosa realizada em crianças em seus protocolos assistenciais, sem aumentar o dimensionamento de enfermeiros para execução de práticas de terapia medicamentosa, o que pode contribuir para que vários erros de medicação atinjam pacientes pediátricos. Outra questão de ordem legal, refere-se à falta de obrigatoriedade de comercialização de medicamentos parenterais com apresentação pediátrica, fato já legislado em vários países, para fármacos utilizados amplamente em crianças [19].

A carência de medicamentos pediátricos estimula o uso *off-label,* cujos efeitos positivos e negativos são pouco conhecidos por evidências científicas e são baseados em extrapolações de doses e/ou modificações de medicamentos aprovados para uso adulto, no entanto, pacientes pediátricos possuem particularidades nas etapas de absorção, distribuição, metabolização e eliminação, sendo diferentes da população adulta e subpopulações pediátricas distintas entre si [20].

Considera-se *off-label* a ocasião em que a prescrição não ocorre concomitante com às indicações terapêuticas, não respeita a dose ou posologia recomendada, modifica a duração do tratamento ou, é destinada a um paciente fora do grupo estabelecido como destinatário ao medicamento [18]. Não existe ainda tradução oficial para o português, então o termo *off-label* é utilizado para se referir ao uso diferente do aprovado em bula ou ao uso de produto não registrado no órgão regulatório de vigilância sanitária no país, que, no Brasil, é a ANVISA [21].

Em clínicas de pediatria algumas áreas fazem maior ou menor uso de medicamentos *off-label*. Na oncologia pediátrica, pelo fato de a maioria dos medicamentos administrados serem injetáveis, o uso de medicamentos *off-label* é considerado pequeno, este uso é encontrado apenas em relação à dose [22].

Oncologia pediátrica

O câncer na infância é considerado uma doença rara. Estima-se que cerca de 3% dos tumores em brasileiros sejam na população pediátrica, com aproximadamente 9.890 casos/ano de tumores pediátricos no país. Em países desenvolvidos, é a primeira causa de morte na infância e, quando não curado, representa uma perda de 70 anos de vida,

enquanto o câncer em adultos representa uma perda de em média 20 anos de vida, apresentando um custo pessoal, familiar e social muito grande [23].

Os cânceres em pacientes pediátricos e adultos diferem principalmente nos aspectos morfológicos do tipo do tumor, comportamento clínico da doença e localizações primárias. Nas crianças e nos adolescentes, a neoplasia geralmente afeta as células do sistema sanguíneo e os tecidos de sustentação. Nos adultos, as células epiteliais, que recobrem órgãos, são as mais atingidas. Enquanto o câncer no adulto apresenta mutações, geralmente, em decorrência de fatores ambientais, como cigarro e exposição ao sol, por exemplo, o câncer pediátrico ainda não possui estudos conclusivos sobre a influência desses aspectos [24].

Para pacientes com faixa etária de 0 a 14 anos, o câncer possui uma classificação diferenciada, que é baseada na morfologia, ao invés do local primário, como ocorrem em pacientes adultos. O câncer é classificado em 12 grupos principais: I. leucemias, doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas; II. Linfomas e neoplasias reticuloendoteliais; III. Tumores do sistema nervoso central (SNC) e miscelânea de neoplasias intracranianas e intraespinhais; IV. Tumores do sistema nervoso simpático; V. Retinoblastoma; VI. Tumores renais; VII. Tumores hepáticos; VIII. Tumores ósseos malignos; IX. Sarcomas de partes moles; X. neoplasias de células germinativas, trofoblásticas e outras gonadais; XI. Carcinomas e outras neoplasias malignas epiteliais e XII. Outros tumores malignos não especificados [25].

Leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, linfomas, tumores do SNC, neuroblastmas, tumores de Wilms, retinoblastomas, osteossarcomas e sarcomas são as neoplasias mais comuns em pacientes pediátricos, apresentam curto período de latência, rápido crescimento e são mais invasivos do que em pacientes adultos [26].

No entanto, o diagnóstico de neoplasias pediátricas é considerado difícil devido aos sinais e sintomas serem semelhantes aos de outras doenças comuns a essa faixa etária. Quando há suspeita do câncer a partir dos primeiros sinais e submete-se o paciente ao tratamento imediato, aumenta a possibilidade de sobrevida, minimizando a taxa de mortalidade por essa doença [27].

A estimativa é que em cada ano do triênio 2020 a 2022, ocorram 8.460 casos de câncer oncológico em pacientes de 0 a 19 anos de idade, sendo os maiores índices esperados nas regiões sudeste e nordeste [28].

No entanto, a sobrevida estimada no Brasil na faixa etária de 0 a 19 anos é de 64%, índice calculado com base nas informações de incidência e mortalidade. Estudo do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde

(INCA/MS) apontou que a sobrevida de pacientes infanto-juvenis varia de acordo com a região do país. Os índices são mais elevados nas regiões Sul (75%) e Sudeste (70%) do que no Centro-oeste (65%), Nordeste (60%) e Norte (50%). Entre 2009 e 2013, o câncer motivou cerca de 12% dos óbitos na faixa etária de 1 a 14 anos, e 8% de 1 a 19 anos. Houve 2.724 mortes por câncer infanto-juvenil no Brasil em 2014 (ano mais recente com informações compiladas). O INCA estimou a ocorrência de 12.600 novos casos de câncer na faixa etária de 0 a 19 anos em 2017. O chamado câncer infanto-juvenil inclui, na verdade, vários tipos de câncer. As leucemias representam o maior percentual de incidência (26%), seguida dos linfomas (14%) e tumores do SNC (13%) [24].

A quimioterapia é definida como o tratamento de característica sistêmica, que utiliza medicamentos potentes e específicos, cujo objetivo é combater células cancerosas, buscando destruir e/ou controlar o seu desenvolvimento, impedindo que continuem se multiplicando rapidamente, aliviando também os sintomas causados por esse crescimento desordenado, apresentando como limitação a falta de seletividade [29].

Terapia antineoplásica

Os antineoplásicos são empregados em forma de protocolos de tratamento, os quais são propostas que combinam diferentes medicamentos e doses, com datas de administração programadas. Os protocolos podem apresentar propostas de combinações de medicamentos com cirurgias e/ou radioterapia, outras formas de tratamento utilizadas no câncer. Além disso, em alguns casos específicos é preconizado o uso de transplante de células tronco hematopoiéticas e variam conforme o diagnóstico, refratariedade, recidiva e remissão da doença oncológica. Estes protocolos estimam a recuperação do organismo do paciente prevendo um período livre de tratamento antes do início de cada novo ciclo de quimioterapia [30, 31].

O avanço da tecnologia na terapia antineoplásica foi de suma importância para o aumento da sobrevida de pacientes com câncer. Na oncologia pediátrica o uso é restrito, porque o tumor pediátrico, por características próprias tem respondido muito bem aos medicamentos quimioterápicos "clássicos", sendo estes utilizados na maioria dos protocolos de tratamento atuais.

É importante reconhecer estes medicamentos, os tumores envolvidos na sua utilização e as toxicidades mais frequentes, são as principais classes de antineoplásicos que vêm sendo utilizadas: antibióticos antitumorais, alcaloides naturais, agentes alquilantes, agentes miscelâneos e agentes antimetabólicos, sendo a alopecia a reação adversa mais comum a essas classes [32].

Segurança na oncologia pediátrica

Os pacientes pediátricos oncológicos se esforçam para enfrentar o câncer e a hospitalização. Os profissionais possuem dificuldades para encontrar estratégias menos traumáticas para ofertar o tratamento, interagindo com uma equipe multiprofissional de forma efetiva e preparando o estado emocional e a rotina dos pacientes, bem como a dos seus familiares [33].

Esses pacientes, em grande parte, utilizam vários medicamentos e estão sujeitos a reinternações frequentes. Consequentemente, essa população específica está mais vulnerável à ocorrência de erros de medicação, os quais correspondem a qualquer evento evitável que pode levar ao uso inadequado de medicamentos, causando algum dano ao paciente, sendo a causa mais frequente de eventos adversos relacionados à segurança do paciente [34].

O Instituto de Medicina dos Estados Unidos analisou 30.121 prontuários de internações e verificou prejuízos iatrogênicos em 3,7% dos casos de internação, sendo destes, 13,6% com evolução ao óbito e 6,5% com disfunções permanentes. No Brasil, devido à precariedade dos serviços de saúde, falta de dimensionamento adequado dos profissionais na qualidade do cuidado, carga horária excessiva e má renumeração salarial, acredita-se que os erros e consequências são superiores aos observados nesse relatório. No entanto, estratégias simples e efetivas como protocolos específicos combinados com barreiras de segurança e implantação de tecnologias elaboradas, podem minimizar e prevenir riscos e danos nos serviços de saúde [35].

Adesão ao tratamento farmacológico

O tratamento antineoplásico consiste em sessões de quimioterapia, radioterapia, cirurgias e ao uso de medicamentos. A adesão e a persistência ao tratamento são influenciadas por fatores relacionados ao paciente, crenças, hábitos de vida e os sérvios de saúde, sendo necessário estratégias para promover o sucesso do tratamento submetido, melhora na qualidade de vida e redução das taxas de mortalidade [36].

A adesão ao tratamento é considerada como o comportamento do paciente relacionado à saúde, seguindo o que foi proposto pela equipe multiprofissional. Por outro lado, a não adesão significa o abandono do tratamento sem intervenção médica ou de outro profissional da saúde [37]. Os efeitos adversos são um fator para a não adesão à terapia pelo paciente e podem influenciar na efetividade, levando a uma progressão da doença [38].

Os fatores que influenciam a adesão ao tratamento são muitos e podem estar relacionados ao perfil sociodemográfico (gênero, idade, etnia, estado civil, escolaridade, nível socioeconômico e hábitos de vida); os relacionados ao paciente (percepção da

seriedade do problema, desconhecimento, experiência com a doença no contexto familiar e autoestima); os relacionados à interação do profissional da saúde com o paciente (comunicação e confiança); os relacionados à doença (problemas de saúde associados e presença de sintomas); os relacionados ao tratamento (quantidade de medicamentos, efeitos adversos, custo e posologia); os relacionados ao serviço de saúde (política de saúde, acesso ao serviço de saúde, tempo de espera versus tempo de atendimento) e os relacionados aos problemas sociais (influência dos amigos e apoio dos familiares) [39].

Determinadas condições de saúde ou tratamentos podem apresentar características que levam a barreiras específicas para a adesão. O abandono de tratamento é definido como falha em iniciar ou completar a terapia, para uma doença potencialmente curável ou definitivamente controlada, e/ou interrupção do tratamento por um período consecutivo de quatro ou mais semanas, sem causa clínica. Para doenças que requerem regime complexo (polifarmácia, várias administrações diárias, dificuldades associadas à via de administração), como asma e diabetes, as próprias dificuldades cotidianas associadas ao uso dos medicamentos constituem barreira importante à adesão ao tratamento [40].

A não adesão ao tratamento não é um fenômeno simples. Os tratamentos medicamentosos de longa duração apresentam diminuição gradativa da adesão ao longo do tempo, pois podem trazer estigma de doente crônico ao indivíduo, levando-o a alterar as doses ou mesmo interromper o tratamento por negação. Quando os pacientes percebem que há necessidade de "sacrifícios" para realizarem o tratamento e que os efeitos indesejáveis dos medicamentos são mais perturbadores que a própria doença, eles invariavelmente não seguem as recomendações. Outro fator interveniente é que os pacientes tendem a interromper o tratamento quando os sintomas melhoram ou desaparecem [41].

Farmácia clínica e atuação do farmacêutico clínico na oncologia

A farmácia clínica possui um papel primordial em conjunto com a equipe de saúde, visando à segurança do paciente, efetividade no tratamento proposto e o uso racional dos medicamentos. O serviço de farmácia clínica hospitalar contribui efetivamente para a qualidade de vida do usuário, especialmente aqueles que se encontram em condições mais vulneráveis, como os pacientes de unidades de terapia intensiva e os pacientes oncológicos [42].

A atuação do farmacêutico clínico foi regulamentada pelo Conselho Federal de Farmácia, por meio da Resolução nº 585, a qual destaca que esse é um dos principais profissionais responsáveis por estabelecer e conduzir uma relação de cuidado centrada no paciente e outras atribuições [43].

O farmacêutico clínico compreende a filosofia da prática e o exercício do processo de cuidado junto à equipe interdisciplinar, a interação com o paciente para obter o histórico dos medicamentos de uso habitual, promover conhecimento sobre medicamentos, incluindo informações específicas sobre ajuste de dose na insuficiência renal, idade ou peso, informações toxicológicas e farmacológicas, instruções sobre administração e substituição de medicamentos, ou qualquer outra dúvida sobre uso de medicamentos. Essas intervenções farmacêuticas são realizadas com a finalidade de garantir o uso correto e seguro dos medicamentos [44].

O farmacêutico clínico atuando na área da oncologia pediátrica é o principal instrumento para garantir a qualidade do tratamento individualizado, realiza atividades de manipulação e gerenciamento de quimioterápicos, avalia prescrição médica no que se refere à viabilidade, estabilidade e compatibilidade físico-química dos componentes entre si, busca encontrar e resolver de maneira sistematizada e documentada os problemas relacionados com os medicamentos que apareçam durante o tratamento do paciente, bem como realizar o acompanhamento do mesmo, monitorando a adesão, técnicas de administração, reações adversas e interação medicamentosa, garantindo um tratamento mais seguro, estando presente durante todo o ciclo terapêutico e complementando os cuidados médicos para, assim, alcançar o sucesso terapêutico [45, 46].

Com isso, no cenário da farmacoterapia, o farmacêutico clínico poderá propor soluções, prever ocorrências e intervir, inclusive interagindo com a equipe multiprofissional em diversas situações, como por exemplo, sobre reação adversa a medicamento (RAM) e problemas relacionados a medicamentos (PRM). A RAM é definida pela OMS como "um efeito nocivo, indesejável e que ocorre em doses normalmente utilizadas em seres humanos para profilaxia, diagnóstico, tratamento de morbidades ou para a modificação de função fisiológica". Segundo alguns autores, o termo RAM pressupõe somente o uso correto do medicamento e expressa o risco inerente a essa utilização [17].

Considerações finais

Os pacientes pediátricos são rotulados como "órfãos terapêuticos", os quais são mais suscetíveis à interação medicamentosa e administração de medicamentos fracionados. Com isso, são tratados com medicamentos que são prescritos sem considerar estritamente suas constituições individuais, sendo uma prática recorrente desenvolvida por prescritores que indicam medicamentos sem recomendação e nem autorização para o uso em crianças.

A utilização de medicamentos em pediatria oncológica, fora dos termos aprovados pelas agências reguladoras nacionais e/ou internacionais, não significa uma má prática

clínica, apenas mostra a inexistência de alternativas terapêuticas eficazes, seguras e validadas para a população pediátrica.

Em contrapartida, a inserção de protocolos para minimizar erros, promovendo acesso a informações sobre os medicamentos e desenvolvendo padrões internos de treinamento, reduz a probabilidade de falhas e aumenta a chance de interrompê-las, antes de resultar em prejuízos ao paciente. Nesse sentido, devem-se incluir estratégias como a educação permanente, a padronização de processos, o uso de recursos de tecnologia da informação e, principalmente, o acompanhamento das práticas profissionais em todas as etapas do processo que envolve a farmacoterapia.

O tratamento oncológico pediátrico é padecido para qualquer paciente, e o torna mais sensível, carente e vulnerável. O paciente merece todo carinho e atenção por parte da equipe de saúde, e a presença do farmacêutico, prestando atenção farmacêutica, ajuda a amenizar o sofrimento e torna a farmacoterapia mais segura, prevenindo e tratando as possíveis reações adversas. O farmacêutico, com caráter humanístico, é capaz de tornar mais leve a vida de uma criação que sofre de uma doença tão complexa e desgastante como o câncer.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. S.M.D. Andrade, M.A. Cunha, E.C. Holanda, G.S.L. Coutinho, R.M.C.L. Verde, E.H.D. Oliveira, Caracterização do perfil das intoxicações medicamentosas por automedicação no Brasil, durante o período de 2010 a 2017, *Res. Soc. Dev.*, **9**(7), 1-16 (2020).

2. D.N.A. Lopes, E.D.R. Neri, L.S. Madeira, P.J. Souza-Neto, A.R.A. Lélis, T.R. Souza, A.B. Oliveira, L.O. Costa, M.M.F. Fonteles, Analysis of similar drug labeling: potential medication erros, *RAMB*, **58**(1), 95-103 (2012).

3. M.A. Makary, M. Daniel, Medical error - the third leading cause of death in the US, *BMJ*, **353**(1), i2139 (2016).

4. J.F. Sampaio, M.F. Costa, Métodos para o tratamento da dor em crianças com câncer, *Alumni-Rev. Disc. UNIABEU*, **5**(10), 4-13 (2018).

5. M.V.V. Simões, J.S. Martins, S.L. Vieira, W.C. Fernandes, C.A. Santana, Cuidados farmacêuticos na adesão da terapia medicamentosa oral em pacientes onco-pediátricos, *Rev. PubSaúde*, **4**, a068 (2020).

6. L.M.M. Sousa, C.M.A. Marques-Vieira, S.P.P. Severino, A.V. Antunes, A metodologia de revisão integrativa da literatura em enfermagem, *Revista Investigação em Enfermagem*, **21**(1), 17-26 (2017).

7. V.K. Cunha, F. Scorsolini-Comin, A dimensão religiosidade/espiritualidade na prática clínica: revisão integrativa da literatura científica, *Psicol: Teor. Pesq.*, **35**(1), e35419 (2019).

8. R.P.A. Antonucci, Preventing medication erros in neonatology: is it a dream? *World J. Clin. Pediatr.*, **3**(3), 37-44 (2014).

9. R.F.F. Souza, L.D. Silva, Estudo exploratório das iniciativas acerca da segurança do paciente em hospitais do Rio de Janeiro, *Rev. Enfer. UERJ*, **22**(1), 22-28 (2014).

10. Brasil, Documento de referência para o Programa Nacional de Segurança ao Paciente, Brasília, 2014, URL: http://pesquisa.bvsalud.org/bvsms/resource/pt/mis-36684, acessado em: abril de 2022.

11. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo 03: Protocolo de segurança na prescrição, uso e administração de medicamentos. Brasília, 2013, URL: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/seguranca-na-prescricao-uso-e-administracao-de-medicamentos, acessado em: abril de 2022.

12. E.F.D.O. Cavalcante, I.R.B.D.O. Pereira, M.J.V.D.F. Leite, A.M.D. Santos, C.A.A. Cavalcante, Implementação dos núcleos de segurança do paciente e as infecções relacionadas à assistência à saúde, *Rev. Gaúcha Enferm.*, **40**(SPE), e20180306 (2019).

13. E.L. Arboit, G. Bellini, C.R. Schütz, M.C.S Moraes, S.S. Kinalski, R.A. Barcellos, A cultura de segurança do paciente na perspectiva multiprofissional, *Res. Soc. Dev.,* **9**(5), e125953088 (2020).

14. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Portaria nº 529, de 1º de abril de 2013b. Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP), Brasília, 2013, URL: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/portaria-529, acessado em: julho de 2021.

15. T.C.A. Teixeira, S.H.B. Cassiani, Root cause analysis of falling accidents and medication errors in hospital, *Acta Paul. Enferm.*, **27**(2), 100-107 (2014).

16. WHO, World Health Organization, Medication without harm: WHO global patient safety challenge, Geneva, 2017, URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255263/1/WHO-HIS-SDS-2017.6-eng.pdf?ua=1, acessado em: setembro de 2020.

17. M.L. Aizenstein, M.H. Tomassi, Problemas relacionados a medicamentos; reações adversas a medicamentos e erros de medicação: a necessidade de uma padronização nas definições e classificações, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **32**(2), 169-173 (2011).

18. C. Barbosa, M.F. Matos, Prescrição *off-label*, direito à informação, consentimento informado e processo clínico eletrônico no direito português, *Rev. CIADS*, **5**(3), 157-179 (2016).

19. M.D.J.C.S. Harada, D.C. Chanes, D.M. Kusahara, M.D.L.G. Pedreira, Segurança na administração de medicamentos em pediatria, *Acta Paul. Enferm.*, **25**(4), 639-642 (2012).

20. M.N.R. Pande, P.D.C. Amarante, T.W.F. Baptista, Este ilustre desconhecido: considerações sobre a prescrição de psicofármacos na primeira infância, *Ciên. Saúde Colet.*, **25**(6), 2305-2314 (2020).

21. Brasil, Assessoria Jurídica do Conselho Federal de Medicina, PARECER Nº 2/16. Uso *off-label* de medicamentos (fora da indicação de bula ou protocolo), Brasília, 2016, URL: http://www.portalmedico.org.br/pareceres/CFM/2016/2_2016.pdf, acessado em: maio, 2020.

22. D.P.S. Menezes, C.O. Marquez, Importância do medicamento na consulta de pacientes pediátricos em uso de medicamentos off-label, *Res. Soc. Dev.*, **10**(15), 1-13 (2021).

23. M.B. Michalowski, C.F. Lorea, A. Rech, P. Santiago, M. Lorenzoni, A. Taniguchi, W.V. Pereira, L.E. Daudt, Diagnóstico precoce em oncologia pediátrica: uma urgência médica, *Bol. Cient. Pediatr.*, **1**(1), 13-18 (2012).

24. INCA, Instituto Nacional de Câncer, Sobrevida de pacientes infantojuvenis com câncer é de 64% no Brasil. Brasília, 2016, URL: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2016/sobrevida_pacientes_infantojuvenis_cancer_64_por_cento_brasil_, acessado em: setembro de 2020.

25. S.V.M. Feliciano, M.O. Santos, M.S.P. Oliveira, Incidência e mortalidade por câncer entre crianças e adolescentes: uma revisão narrativa, *Rev. Bras. Cancerol.*, **64**(3), 389-396 (2018).

26. C.J. Santos-Júnior, C.M.D.S.B. Romão, M.J.R.G. Alves, A.M.C.S. C.S. Batinga, V.M.S. Gomes, N.S. Araújo, R.F. Marinho, L.A.C. Leite, Características clínico-epidemiológicas do câncer infantojuvenil no estado de Alagoas, Brasil, *Rev. Med.*, **97**(5), 454-460 (2018).

27. J.K.O. Friestino, C.R.S. Corrêa, J.F.R. Moreira-Filho, Percepções dos profissionais sobre o diagnóstico precoce do câncer infantojuvenil na atenção primária à saúde, *Rev. Bras. Cancerol.*, **63**(4), 265-272 (2017).

28. N.K.S. Sá, B.C. Aires, M.T.F. Albuquerque, D.N. Matos, Convivência com o câncer pediátrico: o impacto psicossocial nos familiares cuidadores, *Facit Bus Technol. J.*, **1**(23), 222-237 (2021).

29. A.P.Q. Paiva, D.J. Barbosa, P.V.S. Leite, R.M.M. Oliveira, Toxicidade dermatológica causada por quimioterapia no uso do capecitabina, *Rev. Pró-UniverSUS,* **11**(2), 47-55 (2020).

30. R.S. Siebel, M.K. Marchioro, D. Bueno, Estudo de prescrições de antineoplásicos e antimicrobianos em uma unidade de oncologia pediátrica, *Rev. HCPA*, **32**(3), 303-310 (2012).

31. A. Garófolo, C.H. Nakamura, Terapia nutricional de pacientes com câncer infantojuvenil submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, *Rev. Bras. Cancerol.*, **64**(3), 373-381 (2018).

32. A.J. García-Milián, Y. Gálvez-Alvarez, M. González-del Sol, P. León-Cabrera, Patrón de consumo de antineoplásicos utilizados para el tratamiento del cáncer en La Habana del 2011-2015, *Horiz. Sanitario*, **17**(1), 39-50 (2018).

33. A.M.P Sposito, N.R. Garcia-Schinzari, R.M.A. Mitre, L.I. Pfeifer, R.A.G. Lima, L.C. Nascimento, O melhor da hospitalização: contribuições do brincar para o enfrentamento da quimioterapia, *Av. Enferm.*, **36**(3), 328-337 (2018).

34. A.Z. Schuch, J. Zuckermann, M.E.F. Santos, J.K. Martinbiancho, S.D.P. Mahmud, Reconciliação de medicamentos na admissão em uma unidade de oncologia pediátrica**,** *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde,* **4**(2), 35-39 (2013).

35. R.M. Oliveira, I.M.T.D.A. Leitão, L.M.S.D. Silva, S.V. Figueiredo, R.L. Sampaio, M.M. Gondim, Estratégias para promover segurança do paciente: da identifica-

ção dos riscos às práticas baseadas em evidências, *Esc. Anna Nery Rev. Enferm.*, **18**(1), 122-129 (2014).

36. J.B.R. GUEDES, M.R. Guerra, M.M. Alvim, I.C.G. Leite, Fatores associados à adesão e à persistência na hormonioterapia em mulheres com câncer de mama, *Rev. Bras. Epidemiol.*, **20**(4), 636-649, (2017).

37. D.M. Gewehr, V.A.C. Bandeira, G.T. Gelatti, C.D.F. Colet, K.R.D. Oliveira, Adesão ao tratamento farmacológico da hipertensão arterial na Atenção Primária à Saúde, *Saúde Debate,* **42**(116), 179-190 (2018).

38. M.S. Pinho, P.A. Abreu, T.A. Nogueira, Atenção farmacêutica a pacientes oncológicos: uma revisão integrativa da literatura, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **7**(1), 33-39 (2016).

39. J.G.A. Freitas, S.O. Nielson, C.C. Porto, Adesão ao tratamento farmacológico em idosos hipertensos: uma revisão integrativa da literatura, *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, **13**(1), 75-84 (2015).

40. C.I. Coleman, B. Limone, D.M. Sobieraj, S. Lee, M.S. Roberts, R. Kaur, T. Alam, Dosing frequency and medication adherence in chronic disease, *J. Manag. Care Pharm.*, **18**(7), 527-539 (2012).

41. S.A. Steiner, M.R.F. Torres, F.J. Penna, M.D.C.B.D. Melo, Adesão ao tratamento de doenças crônicas em pediatria: uma revisão crítica da literatura, *Rev. Méd. Minas Gerais*, **23**(2), 5-11 (2013).

42. E.A.T. Bernardi, R. Rodrigues, G.G. Tomporoski, V.M.S. Andrezejevski, Implantação da avaliação farmacêutica da prescrição médica e as ações de farmácia clínica em um hospital oncológico do sul do Brasil, *Rev. Esp. Saúde*, **15**(2), 29-36 (2014).

43. CFF, Conselho Federal de Farmácia, Resolução nº 585, de 29 de agosto de 2013. Regulamenta as atribuições clínicas do farmacêutico e dá outras providências, Brasília, 2013, URL: http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/585.pdf, acessado em: junho de 2021.

44. T.M.M. Miranda, S. Petriccione, F.T. Ferracini, W.M. Borges-Filho, Intervenções realizadas pelo farmacêutico clínico na unidade de primeiro atendimento, *Einstein* (*São Paulo*), **10**(1), 74-78 (2012).

45. S.L.F. Santos, H.H.S. Alves, C.V. Pessoa, H.S.T.T. Saraiva, K.B.N.T. Barros, Evidências do cuidado farmacêutico na prática clínica da oncologia, *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*, **20**(2), 77-81 (2018).

46. P.K. Santos, J.P. Dias, A.M.D.L.E. Neves, Atenção farmacêutica no tratamento oncológico em uma instituição pública de Montes Claros-MG, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **3**(1), 11-14 (2012).

Como citar este artigo

a.L. Barboza, A.P. de Castro-Teixeira, C. de Albuquerque-Montenegro, M.E. da Silva-Menezes, F. de Sousa-Oliveira, A segurança da farmacoterapia em pacientes oncológicos pediátricos: uma revisão de literatura, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **51**(3), 337-355 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102283

Artículo de revisión / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.93531*

Cronofarmacología de los psicofármacos: Revisión de tema

Paula Sofía Moreno Castro[a], Paula Alejandra Sánchez Correa[b], Álvaro Vallejos Narváez[c*]

Facultad de Medicina, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá D. C., Colombia.

Correos electrónicos:

[a]psmoreno@fucsalud.edu.co

[b]pasanchez2@fucsalud.edu.co

[c]avallejos@fucsalud.edu.co

Recibido: 24 de octubre de 2022

Revisado: 9 de enero de 2023

Aceptado: 16 de enero de 2023

Resumen

Introducción: es de vital importancia para el manejo de nuestros pacientes darles el mejor tratamiento farmacológico, y así como educarles respecto a cómo y por qué se deben tomar los medicamentos en un horario específico. Existe evidencia científica que respalda la administración de medicamentos a determinados horarios y sus beneficios. En la práctica diaria se ve la necesidad de educar tanto a pacientes como personal médico para el adecuado uso de los medicamentos. La aplicación de los principios cronofarmacológicos en el tratamiento de las enfermedades psiquiátricas como depresión, esquizofrenia, *delirium*, Parkinson e insomnio; apoya la eficacia terapéutica de los medicamentos y la disminución de efectos adversos. **Métodos**: se realizó una búsqueda de la literatura en diferentes bases de datos como PubMed, Embase, Google Académico, únicamente se incluyeron artículos, tesis o libros publicados, que se encontraran en idioma inglés o español y que independientemente del tipo de artículo hiciera alusión a la cronofarmacología, su importancia, sus hallazgos y avances. **Resultados**: muchos neurotransmisores y sistemas hormonales se ven involucrados en este proceso como la serotonina, glucocorticoides, glutamato, melatonina, GABA, entre otros. La transcripción de estas señales modifica lo que se conoce como genes de reloj, los cuales la mayoría se encuentran en el cromosoma 4 y se encargan de modificar los ritmos biológicos animales, generando trastornos mentales y cambios comportamentales. Teniendo en cuenta esta potencial diana terapéutica, el interés que ha despertado la cronoterapia y cronofarmacología en pobla-

ción psiquiátrica ha venido creciendo exponencialmente. Enfermedades mentales tanto agudas como crónicas, han demostrado su comportamiento siguiendo los relojes biológicos internos, con mejores opciones terapéuticas, mejor tolerabilidad y mejor respuesta farmacológica. **Discusión y conclusiones**: muchas enfermedades mentales se ven afectadas con las alteraciones en los ciclos circadianos, es por esto que con el conocimiento en cronofarmacología se puede optimizar el manejo a los pacientes, mejorando la eficacia de los medicamentos y disminuyendo los efectos adversos los cuales tienen gran dificultad en psiquiatría donde se ve la falta de adherencia a la medicación con mayor prevalencia que en otras patologías. Se espera que esta revisión sea una motivación para nuevas investigaciones en el país sobre la administración de medicamentos, ritmos biológicos y su importancia clínica.

Palabras claves: Ritmo circadiano**,** psiquiatría, psicopatología, trastornos cronobiológicos, cronoterapia farmacológica.

SUMMARY

Chronopharmacology of psychotropic drugs: Review

Introduction: it is of vital importance for the management of our patients to give them the best pharmacological treatment, as well as to educate them regarding how and why they should take the medications at a specific time. There is scientific evidence that supports the administration of medications at certain times and its benefits. In daily practice, there is a need to educate both patients and medical personnel on the proper use of medications. The application of chronopharmacological principles in the treatment of psychiatric illnesses such as depression, schizophrenia, *delirium*, Parkinson's and insomnia; supports the therapeutic efficacy of drugs and the reduction of adverse effects. **Methods**: a literature search was carried out in different databases such as PubMed, Embase, Google Scholar, only published articles, theses or books were included, which were in English or Spanish and regardless of the type of article referred to chronopharmacology, its importance, its findings and advances. **Results**: many neurotransmitters and hormonal systems are involved in this process, such as serotonin, glucocorticoids, glutamate, melatonin, GABA, among others. The transcription of these signals modifies what are known as clock genes, most of which are found on chromosome 4 and are responsible for modifying animal biological rhythms, generating mental disorders and behavioral changes. Taking this potential therapeutic target into account, the interest aroused by chronotherapy and chronopharmacology in the psychiatric population has been growing exponentially. Both acute and chronic mental

illnesses have shown their behavior following internal biological clocks, with better therapeutic options, better tolerability and better pharmacological response. **Discussion and Conclusions**: many mental illnesses are affected by alterations in circadian cycles, which is why, with knowledge in chronopharmacology, patient management can be optimized, improving the efficacy of medications and reducing adverse effects, which are very difficult in psychiatry, where the lack of adherence to medication is seen with greater prevalence than in other pathologies. It is hoped that this review will launch new research in the country on drug delivery and biological rhythms and their clinical importance.

Key words: Circadian rhythm, psychiatry, psychopathology, chronobiology disorders, drug chronotherapy.

RESUMO

Cronofarmacologia de psicofármacos: revisão do tema

Introdução: é de vital importância para o manejo de nossos pacientes dar-lhes o melhor tratamento farmacológico, bem como educá-los sobre como e por que os medicamentos devem ser tomados em um horário específico. Existem evidências científicas que apóiam a administração de medicamentos em determinados horários e seus benefícios. Na prática diária, existe a necessidade de educar tanto os pacientes quanto a equipe médica para o uso adequado de medicamentos. A aplicação dos princípios cronofarmacológicos no tratamento de doenças psiquiátricas como depressão, esquizofrenia, *delirium*, Parkinson e insônia; apoia a eficácia terapêutica dos medicamentos e a redução dos efeitos adversos. **Métodos:** foi realizada uma busca da literatura em diferentes bases de dados como PubMed, Embase, Google Acadêmico, foram incluídos apenas artigos, teses ou livros publicados, que estivessem em inglês ou espanhol e que, independentemente do tipo de artigo, aludissem a Cronofarmacologia, sua importância, suas descobertas e avanços. **Resultados:** muitos neurotransmissores e sistemas hormonais estão envolvidos neste processo como a serotonina, glucocorticóides, glutamato, melatonina, GABA, entre outros. A transcrição desses sinais modifica os chamados genes do relógio, a maioria dos quais se encontra no cromossomo 4 e são responsáveis por modificar os ritmos biológicos dos animais, gerando transtornos mentais e alterações comportamentais. Tendo em conta este potencial alvo terapêutico, o interesse que a cronoterapia e a cronofarmacologia têm despertado na população psiquiátrica tem vindo a crescer exponencialmente. Tanto as doenças mentais agudas quanto as crônicas têm demonstrado seu comporta-

mento seguindo os relógios biológicos internos, com melhores opções terapêuticas, melhor tolerabilidade e melhor resposta farmacológica. **Discussão e conclusões:** muitas doenças mentais são afetadas por alterações nos ciclos circadianos, pelo que com conhecimentos em cronofarmacologia pode otimizar-se a gestão do doente, melhorando a eficácia dos medicamentos e reduzindo os efeitos adversos que estes apresentam grande dificuldade em psiquiatria onde falta de adesão à medicação é observada com maior prevalência do que em outras patologias. Espera-se que esta revisão seja uma motivação para novas pesquisas no país sobre administração de medicamentos, ritmos biológicos e seu significado clínico.

Palavras-chave: Ritmo circadiano, psiquiatria, psicopatologia, distúrbios cronobiológicos, cronoterapia farmacológica.

INTRODUCCIÓN

Históricamente la cronobiología médica empieza a tomar fuerza en 1971, inicialmente hizo parte de la endocrinología durante los años 70 y 80 [1]. Se habla de homeostasis desde 1928 cuando Walter Cannon lo definió como los mecanismos que tienden a la estabilidad en la composición bioquímica de los líquidos, células y tejidos, para mantener la vida [1]. Luego la cronofarmacología empieza a tomar fuerza como tratamiento prometedor para evitar los efectos secundarios de los medicamentos. Posteriormente la cronofarmacología es la rama de la farmacología que estudia los efectos de los fármacos en el organismo en función de estos ritmos biológicos [2], y su importancia en la terapéutica radica en la disminución o erradicación de síntomas y efectos adversos en los pacientes.

El estudio de los ritmos biológicos es conocido como cronobiología y toma importancia por los patrones del funcionamiento de procesos hormonales, fisiológicos y bioquímicos [3]. Para la regulación de estos se requiere de una sincronización interna, la cual está en constante cambio y modificación por las señales externas o Zeitgebers [4].

Para entender los ritmos biológicos, se deben tener en cuenta la frecuencia, amplitud y fase. La frecuencia es el número de ciclos por unidad de tiempo, la amplitud es la magnitud del cambio en cada ciclo y la fase es la relación entre lo endógeno y lo exógeno. La acrofase es el momento cuando se produce el pico máximo del ciclo, y el mesor es el valor medio de la función rítmica, es decir el punto medio entre valle y pico de la curva [4]. Los ritmos biológicos se clasifican y se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los ritmos biológicos según el tiempo de oscilación

Ritmo biológico	Tiempo de oscilación (horas)
Circadianos	20 a 28
Ultradianos	Menor a 20
Infradianos	Mayor a 28

También es importante destacar términos básicos de gran utilidad en este tema como lo son la cronofarmacocinética: donde se tiene en cuenta la variación en el tiempo de parámetros farmacocinéticos, esto cobra vital importancia sobre todo en sustancias de rango terapéutico estrecho, o sustancias con variabilidad individual cómo, por ejemplo, carbamazepina, litio y ácido valproico [5, 6]. La cronoestesia estudia la interacción que hay entre el fármaco y su receptor, teniendo en cuenta la susceptibilidad a lo largo del día. La cronoergía es la respuesta que tiene el organismo al fármaco en función del tiempo teniendo en cuenta la cronoestesia y la cronofarmacocinética y la cronotoxicidad es la vulnerabilidad que se tiene a los efectos tóxicos de un medicamento en función de los ritmos biológicos [5, 6].

Por esto nuestro interés radica en indagar acerca de la importancia de la cronofarmacología y los ritmos biológicos en relación con las patologías psiquiátricas. Dentro de los objetivos secundarios de esta revisión de tema descriptiva, se encuentran identificar cuáles son los mecanismos fisiológicos y genéticos que se asocian con los ritmos circadianos, correlacionar la fisiopatología de la alteración de los ritmos circadianos y la enfermedad en general, y por último realizar una aproximación a la cronopsiquiatría.

Metodología

Se realizó una búsqueda final de la literatura hasta el día 30 de noviembre de 2020, desde el inicio de las bases de datos hasta la actualidad. Se realizó la búsqueda con los términos: cronofarmacología, ritmo circadiano y psicopatología, enfermedad mental/ psiquiatría y farmacoterapia, cronoterapia y cronobiología, en las bases de datos de PubMed, Embase y Google Académico, Dentro de los criterios de selección para la búsqueda de literatura comprendida entre el 1ro de octubre de 2020 hasta el 22 de abril de 2021, se incluyeron artículos, tesis o libros publicados, que se encontraran en idioma inglés o español y que independientemente del tipo de artículo hiciera alusión a la cronofarmacología, su importancia, sus hallazgos y avances.

Ritmo circadiano

El término circadiano se utilizó por primera vez en 1959 por Franz Halberg [7], el cual significa "aproximadamente un día", proviene del latín *circa: aproximadamente* y *diem: día*, haciendo referencia a los "días endógenos" que pueden ser más cortos o más largo que 24 horas [8]. Los ritmos circadianos oscilan durante un período de 24 h e impactan en muchos procesos fisiológicos [9], genera y mantiene los procesos biológicos y su sincronización con el medio ambiente. Este sistema se compone de un reloj biológico el cual funciona como un marcapasos [10] y se encuentra localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. Su principal función es mantener la organización temporal de procesos internos del organismo y la sincronización con el ambiente externo gracias a mecanismos de receptores y transductores de señales [11]. El tracto neuro hipotalámico comienza con las células ganglionares de la retina que contienen melanopsina (fotorreceptor) y termina en el NSQ [12]. La acción del glutamato es fundamental ya que de esta depende la activación del tracto retino hipotalámico y la liberación de melatonina y neuropéptido Y [2]. Este hace que se activen los receptores retinianos por medio de sus propiedades electrofisiológicas [11]. Este tracto se encarga de regular al alza la expresión genética del reloj biológico y aumenta la actividad neuronal en el NSQ [13].

Los estímulos o señales provenientes del exterior se conocen como Zeitgebers, donde el más importante para el NSQ es el ciclo luz y oscuridad, otros son la temperatura corporal, la frecuencia cardiaca, niveles hormonales, entre otros [11]. Además de los anteriores también se ve influenciado por la ingesta de alimentos, presión arterial y actividad física [13].

Otro neurotransmisor fundamental en el ciclo circadiano es la serotonina. Las fibras serotoninérgicas del núcleo del rafe, liberan serotonina en presencia de glucocorticoides y actividad motora, lo que influye en la retroalimentación del NSQ. La liberación de serotonina neuronal en el NSQ se produce en ausencia de estimulación de luz y los niveles de serotonina aumentan en el núcleo del rafe después del comienzo de la fase oscura [13]. El triptófano hidroxilasa (TpH), alcanza su punto máximo durante la fase arca, lo que ayuda a la interacción entre el sistema serotoninérgico y el NSQ a través del incremento de los niveles de serotonina.

Las señales hormonales que recibe el SNC también influye en la sincronización interna, la cual es proporcionada por glucocorticoides suprarrenales, melatonina, leptina, insulina, las cuales por medio de vías multisinápticas modulan el comportamiento [13]. Un ejemplo claro de esto se muestra en la figura 1.



Figura 1. Ejemplos de algunas hormonas y su implicación en la conducta (elaborada por los investigadores).

Dentro de la regulación neuro hormonal los principales actores son los glucocorticoides los cuales se liberan en ritmos ultradianos y circadianos, la liberación máxima de estos se produce antes de empezar la actividad diaria y depende de la liberación de ACTH durante el día, la cual aumenta con eventos vitales estresantes que activan el eje HHA y el sistema nervioso autónomo. El papel de los glucocorticoides a nivel periférico es importante para la expresión de genes específicamente en hígado y tejido graso [13].

Uno de los procesos más importantes que ocurren durante la regulación del ritmo biológico es la secreción de melatonina; la cual sucede durante la noche y es inhibida por la luz [11] (**Figura 2)**. Su liberación se ajusta según la duración de la noche y en condiciones normales su pico máximo de liberación es en el momento de mínima vigilancia y va disminuyendo a medida que se acerca la vigilia o el despertar [13, 14]. La liberación nocturna de melatonina es inducida por la entrada de luz en el NSQ por las vías aferentes noradrenérgicas (simpáticas) del núcleo paraventricular (NPV) a la glándula pineal. La melatonina induce el sueño al inhibir los centros neurales como el locus coeruleus (LC) y los núcleos del rafe, los cuales median la excitación a través del núcleo preóptico ventrolateral del hipotálamo (NPVL). Se ha determinado que los agonistas del receptor de melatonina aumentan la actividad neuronal monoaminérgica y contribuyen a la regulación de la neurotransmisión de dopamina y serotonina (5-HT). El NSQ modula la liberación de melatonina principalmente a través de neuronas del ácido γ-aminobutírico (GABA) que se proyectan desde el NSQ al NPV. La luz del día por la mañana y la luz brillante por la noche activan las neuronas NSQ que inhiben las mismas neuronas NPV a través de proyecciones GABAérgicas y cesan la secreción de melatonina [14].

No solo el sistema nervioso central funciona como oscilador principal, también hay otros mecanismos que ayudan con la regulación de los ritmos biológicos como la acti-

vidad fisiológica, la alimentación, la temperatura corporal, las cuales a su vez modifican la activación genética [15]. También hay osciladores en tejidos periféricos como en el hígado, intestino, corazón, retina y algunas áreas del cerebro [15]. La melatonina juega un importante papel en la regulación del sueño, su síntesis se empieza a producir aproximadamente 2 horas antes de la hora regular de dormir del sujeto y se relaciona el pico de secreción con el sueño [16].

Factores genéticos

La oscilación del ciclo sueño vigilia se conforma de ciclos de retroalimentación positiva y negativa, los cuales modifican la transcripción y la translación de los genes que se conocen como "genes de reloj" [10]. Se presentan vías autonómicas y ciclos anti reguladores que generan cambios en la presentación molecular de estos genes [2].

Todo ser vivo está equipado con un reloj molecular, el cual resulta de bucles transcripcionales y postransduccionales interconectados y autorregulados por una gran red genética,

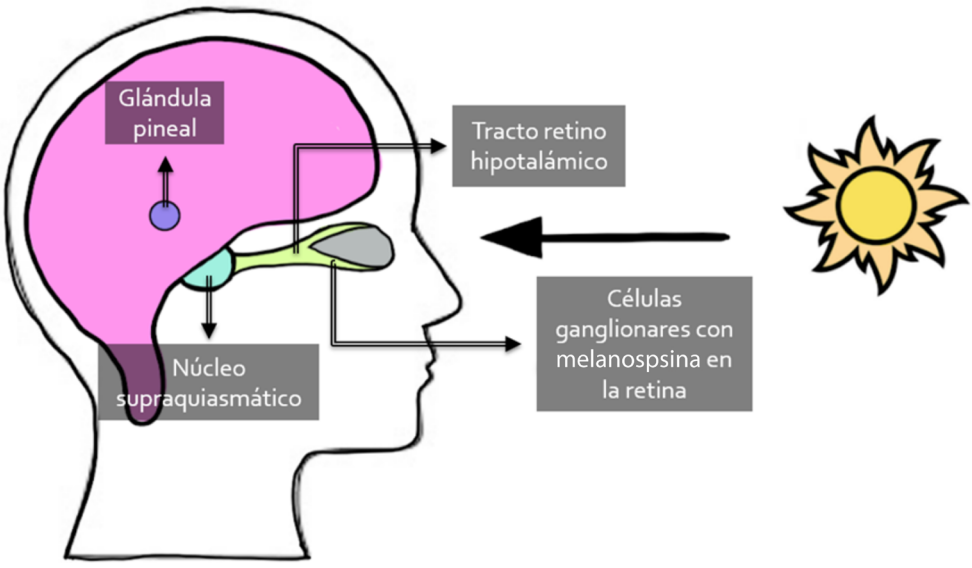


Figura 2. Luz y melatonina (elaborada por los investigadores). Al recibir los ojos luz solar, la producción de melatonina en la glándula pineal se inhibe y las hormonas producidas nos mantienen despiertos. A su vez, cuando los ojos no reciben luz, se produce melatonina en la glándula pineal y el humano se cansa [17].

proteínas como las quinasas, que se encargan del control y la estabilidad de las proteínas de reloj; regulando así su abundancia, actividad y localización intranuclear [18].

Los genes de reloj que se encuentran asociados son: la proteína 1 similar a ARNt cerebral (BMAL1), los ciclos de producción locomotora circadiana Kaput (CLOCK), la proteína de dominio PAS neuronal 2 (NPAS2), el gen Periodo (PER1, PER2 y PER3) y el criptocromo (CRY1 y CRY2) (15). La expresión genética de los genes de reloj también está regulada por la melatonina, específicamente de los genes PER1, PER2, BMAL1, CLOCK, Rev-Erbα y CRY1. Aparte de estos genes, los cuales la mayoría se encuentran ubicados en el cromosoma 4, también se han encontrado otros como el receptor de ácido retinoico (ROR), la caseína quinasa 1 (CK1) los cuales regulan a su vez la transcripción del gen BMAL1 [19].

Los genes BMAL1 y CLOCK se dimerizan y forman el heterodímero CLOCK-BMAL, el cual aumenta la transcripción de proteínas *Period* (*Per 1 y 2)* y *Cryptochrome* (*Cry 1 y 2*) [15], los cuales se expresan y se acumulan en el citoplasma, reprimiendo la actividad de CLOCK-BMAL, inhibiendo la transcripción de sus propios genes [10] por medio de la expresión de Rev-Erbα y la fosforilación de la casein-kinasa I (CKI) y glucógeno-sintetasa-kinasa 3β (GSK3 β) [4]. También en la actividad de BMALL se regula gracias al receptor nuclear de ácido retinoico ROR, el cual tiene los mismos sitios de unión que Rev-Erbα [15].

Se ha comprobado que la depleción del gen CLOCK en ratones causa disminución en el sueño NO REM de aproximadamente 60–120 minutos versus controles, la depleción de BMAL1 genera un cambio en la arquitectura y duración del sueño, las mutaciones en el gen CRY producen etapas anormales del sueño produciendo un aumento patológico de la duración del sueño NO REM [20].

También se han identificado otros genes que se encuentran alterados y que se asocian con enfermedad afectiva, un ejemplo de esto es en el caso del trastorno afectivo estacional, donde la evidencia ha mostrado variaciones en los genes PER2, ARNTL y NPAS2, o como sucede con el trastorno afectivo bipolar que se presentan polimorfismos en los genes ARNTL y PER3 [4, 20].

Estos genes no solo se expresan en el NSQ, que es el principal motor de este reloj biológico, sino también en todas las células del cerebro y en aquellos órganos que también presentan relojes internos.

1. Factores externos que intervienen

La modificación de los ritmos biológicos depende de señales ambientales o Zeitgebers. El zeitgeber principal para el NSQ es el ciclo luz-oscuridad [20], en la especie humana.

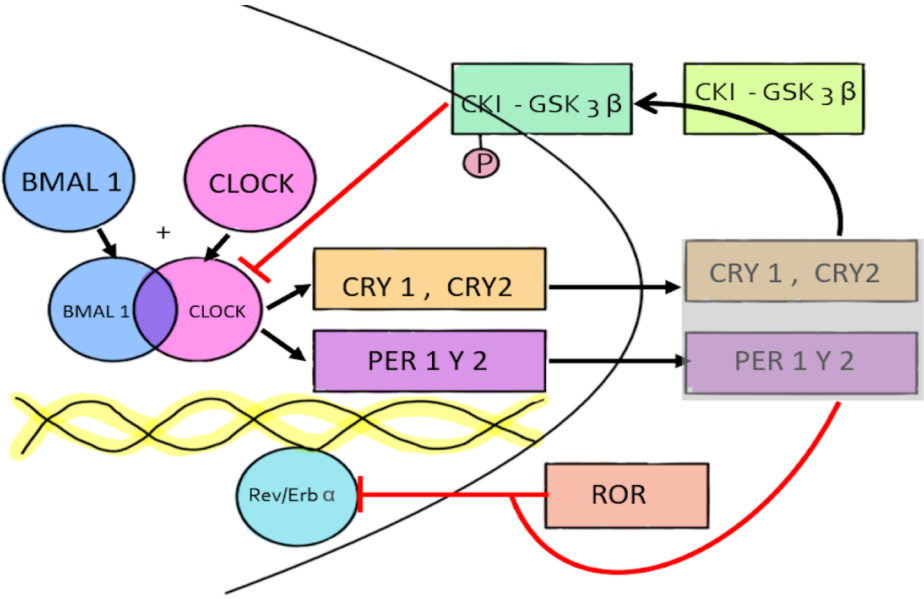


Figura 3. Interacción entre los genes de reloj. Adaptado de: S. Nibourg, Is chronotherapy effective for Parkinson Disease? Bachelor thesis Biology. Biomedical Sciences, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, the Netherlands (2014) [15].

Otros factores que influyen son la altitud, los cambios estacionales, la exposición a luz artificial [20], también debemos incluir los factores sociales, ya que estos van a ser los principales modificadores de la conducta [4]. La frecuencia de ocurrencia de estos Zeitgebers, determinará la adecuada regulación de este reloj endógeno [20].

Al NSQ llegan eferencias de la hipófisis, donde la melatonina u hormona del sueño, es secretada durante la noche, según el ciclo sueño-vigilia. La melatonina controla los ritmos biológicos endógenos [16], su síntesis inicia con la captación de L-Triptófano en las células lineales. A través de la retina, la hipófisis recibe la información fótica. La luz ambiental tiene una influencia directa en el ritmo de secreción de la melatonina, ya que los pulsos de luz suprimen su producción, y la duración de su producción depende del periodo de oscuridad. La melatonina actúa por medio de tres receptores de tipo proteína G: MT 1-2-3. En este proceso no solo actúa la melatonina, la dopamina también tiene un papel importante en la fisiología retiniana y el ciclo sueño-vigilia [4]. La dopamina es fundamental en el proceso de adaptación a la luz [15].

Un proceso que es muy claro es que los cambios en los ciclos de luz y oscuridad influyen en el estado de ánimo, al modificar los ritmos circadianos. la constante exposición a la

luz induce un comportamiento similar al de la persona con depresión, lo que conlleva de manera empírica a pensar en una relación causal [4].

Mecanismos de alteración del ritmo circadiano (fisiopatología)

Desincronización

Para hablar de las alteraciones del ciclo biológico, debemos primero hablar de las dos grandes causas que nos produce esta disfunción; para esto se debe mencionar la desincronización externa e interna.

La desincronización externa, se da comúnmente por cambios en el periodo o fase del ritmo causadas por mutaciones genéticas, dentro de las alteraciones más frecuentes asociadas a la desincronización externa están las personas con cronotipos extremos o aquellos que trabajan por turnos [11]. La privación de la luz causa una reducción significativa en la población de neuronas monoaminérgicas, especialmente la serotonina, en el núcleo accumbens, núcleo del rafe y área tegmental ventral [4]. No solo están involucradas las neuronas serotoninérgicas, también la expresión de la dopamina y somatostatina cambia según la exposición a la luz en el hipotálamo [4]. Con respecto a los cronotipos tardíos y su asociación con los trastornos en el estado de ánimo, cuando una persona se levanta tarde y trabaja en horas de la noche, habrá una exposición a la luz solar reducida, lo que conlleva a una disminución en los niveles de vitamina D, que se sintetiza en la piel gracias a la radiación UV [4].

En cuanto a la desincronización interna, se relaciona con las fluctuaciones de los neurotransmisores y niveles hormonales [4], la cual debe ser coordinada entre diferentes órganos, tejidos y células. La idea de la sincronización interna es que estos procesos fisiológicos sean compatibles con la vida. Esta sincronización interna sugiere que los trastornos del estado de ánimo están ligados a mutaciones en los genes que participan en el reloj biológico y que conducen a alteraciones metabólicas y en consecuencia en el organismo. Un factor a tener en cuenta en la desincronización es el envejecimiento, el cual está asociado con una disminución en la efectividad del sueño y una reducción en la amplitud de la secreción de melatonina [16].

En condiciones normales, estos relojes biológicos aseguran la sincronización entre estos procesos fisiológicos del cuerpo, en especial aquellos que son opuestos, por ejemplo, procesos anabólicos vs. procesos catabólicos; es por esto que, en una amplitud de ritmo biológico disminuida, hay más probabilidades de presentar alteraciones circadianas, mientras que una amplitud aumentada puede producir trastornos del ánimo, por una desestabilización del sistema circadiano [4].

Los trabajos por turnos están asociados a mortalidad, trastornos mentales, metabólicos, y del sueño, específicamente los turnos nocturnos contribuyen a la aparición de trastornos psiquiátricos por medio de la desalineación circadiana, privación del sueño y supresión de melatonina; en el TAB existen múltiples variables genéticas que pueden verse afectadas por el trabajo por turnos haciendo de esta forma más susceptibles a algunas personas a padecer TAB asociado a trastornos del ritmo circadiano. En el trastorno depresivo mayor también podemos encontrar variantes genéticas que pueden verse afectadas por el trabajo por turnos aumentando la susceptibilidad a padecerla [21].

Aplicaciones clínicas de la cronofarmacología

La importancia de la cronofarmacología radica básicamente en la variabilidad circadiana en la respuesta a los medicamentos, la cual juega un papel muy importante desde el punto de vista clínico. Teniendo en cuenta los parámetros de la farmacología, existe la cronofarmacocinética; la cual considera la variación temporal de los parámetros farmacocinéticos (semivida del fármaco T½, tiempo de máxima concentración Tmax, área bajo la curva AUC) [3] a nivel hepático, la enzima CYP 4A3 ha demostrado tener variaciones circadianas junto con la N-acetiltransferasa en el metabolismo de los fármacos. En cuanto a la cronofarmacodinamia, es el estudio de la interacción fármaco receptor, pero acá toma importancia la cronoestesia la cual considera las variaciones en la interacción fármaco receptor a lo largo del día [3].

Muchas patologías han demostrado un patrón oscilatorio, que refuerza la idea con la administración cronobiológica de los medicamentos, ejemplos de esto son: respecto a las patologías oculares, la que más se ha asociado con un patrón circadiano, es el glaucoma ya que la presión intraocular se aumenta en horas de la madrugada disminuye en horas de la tarde. En cardiología, se asocia una mayor presentación de IAM en horas de la madrugada, lo que se relaciona también con una mayor agregación plaquetaria, disminución de la actividad fibrinolítica que conlleva a un estado procoagulante [22], es por esto que los medicamentos con acción cardiaca y antihipertensiva, deben ser administrados en la noche o temprano en la mañana [2]. En enfermedades pulmonares, se conoce que la resistencia de la vía aérea alcanza mayores niveles en la noche, es por esto que durante la noche se presentan más crisis de asma bronquial, y como consecuencia se entiende que la administración de broncodilatadores se debe realizar en horas de la tarde [2].

Respecto a la enfermedad neoplásica, muchas oscilaciones funcionales se asocian a pronóstico y supervivencia, por ejemplo, se ha demostrado que en personas que tienen un ritmo biológico extremo, se presenta mayor incidencia de riesgo a tumores malignos

[23]. Esto se corrobora con el estudio de la cohorte de salud de las enfermeras (NHS), realizado entre junio de 1976 y diciembre de 1976, donde se encontró que el trabajo nocturno rotativo se asociaba con mayor riesgo de cáncer de mama (36%), cáncer colorrectal (35%) y cáncer de endometrio (43%), independientemente de otros factores de riesgo [18].

Con la administración de los agentes quimioterapéuticos debe tenerse en cuenta la farmacocinética plasmática, una Cmax baja y un aumento en el área bajo la curva (AUC) favorecen la tolerabilidad y eficacia [24]. Un estudio realizado en 1995 [25] demostró que la concentración plasmática del fluorouracilo presentaba mejores picos de concentración cuando se administró a las 4am versus la 1 pm o 7 pm, encontrando que los dos últimos esquemas mostraron mayor toxicidad en los pacientes. Lo que explicaría que los medicamentos deben ser administrados de forma crono modulada para lograr menos toxicidad y mayor efectividad [26].

El dolor también se rige por ritmos biológicos, explicados por la permeabilidad de la piel la cual tiene significancia terapéutica a la hora de la absorción de los medicamentos [2], un ejemplo en el uso de la cronofarmacología en este caso es en los pacientes con osteoartritis los cuales presentan menos dolor en horas de la mañana, mientras que los que tienen artritis reumatoidea presentaron mayor dolor en la mañana [2], esto con el fin de mejorar la hora de administración o aplicación de anestésicos para disminuir o mitigar los síntomas.

Por último como hemos visto el ritmo circadiano está envuelto en múltiples circunstancias de la vida y no es la excepción en el entorno de la pandemia que nos aqueja en este momento, es así como nos encontramos con que existe una variación en el sistema inmunológico a lo largo del día, por ejemplo existe una asociación entre ritmo circadiano y la necesidad de hospitalización por influenza, se espera que con el tiempo se logren hacer estudios que asocian la infección de COVID 19 con las alteraciones en el ritmo circadiano de los trabajadores nocturnos. El reloj biológico de cada individuo puede modificar la infección y respuesta inmunológica del paciente, así que al momento de la aplicación de una vacuna o medicación puede servir para atenuar la gravedad de la enfermedad [27].

Cronopsiquiatría

Dentro de la investigación circadiana se ha visto mucho interés en patologías cardiovasculares y en oncología, sin embargo, el interés que ha despertado la cronoterapia y cronofarmacología en población psiquiátrica ha venido creciendo exponencialmente.

Delirium

El *delirium* tiene una alta prevalencia en pacientes hospitalizados y en UCI [28]. Es caracterizado por una alteración aguda del estado de conciencia, con disfunción cognitiva y fluctuaciones durante el día [29].

Los periodos donde es más crítica la clínica y los síntomas son más agudos son en horas de la noche, en lo que se conoce como síndrome del ocaso, donde sumado a la oscuridad y el silencio, la actividad dopaminérgica cerebral aumenta, lo que favorece la presencia de alucinaciones [7, 30].

Guo *et al.* [31] encontraron que, en las muestras de orina nocturna en posoperatorios, había un aumento significativo en los niveles de la melatonina y una disminución del cortisol en el grupo de intervenciones no farmacológicas (medidas *antidelirium*) versus el grupo control, lo que suponía una mejoría en el ritmo circadiano.

Depresión

Los ritmos circadianos y la depresión tienen una relación significativa, ya que los tratamientos buscan normalizar los cambios de los ritmos circadianos que se producen en la depresión. La reducción de la calidad de sueño se asocia a trastornos del estado de ánimo [32]. Se ha investigado el polimorfismo del gen PER3, el cual en ratones ha evidenciado cambios en la arquitectura del sueño y un comportamiento similar a la depresión, el polimorfismo gen CLOCKD19 demuestra comportamiento similar a la manía y disminución de sueño, los ratones con deficiencia de Cry 1 y 2 demuestran comportamientos ansiosos y aumento de sueño [11].

La mayoría de las personas con depresión experimentan trastornos de sueño (70-80%), como disminución en la necesidad del sueño y despertares tempranos, estas alteraciones en la calidad de sueño se consideran como síntomas de la depresión [11]. Se sabe que el sueño influye en la corteza prefrontal, amígdala y locus coeruleus, por lo que es importante que la calidad de sueño sea adecuada para las funciones afectivas. Además, los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica también tienen un patrón circadiano [33], y el núcleo del rafe también es sensible a la luz y recibe aferencias serotoninérgicas.

En cuanto a los Zeitgebers sociales, serán los que nos determinen los horarios de alimentación, horarios de sueño, ejercicio, entre otros, por lo que estos tendrán la capacidad de modificar los ritmos circadianos. Estos acontecimientos vitales, junto con una capacidad de afrontamiento debilitada podrían ser determinantes y coadyuvantes en la disrupción circadiana [11].

La importancia de la luz solar en la depresión juega un papel fundamental ya que, la privación de esta genera una reducción de las neuronas monoaminérgicas en el cerebro especialmente en el núcleo accumbens, núcleo del rafe y área tegmental ventral [4]. Se conoce que, en el trastorno afectivo estacional, la ausencia de luz, causa síntomas depresivos, es decir en invierno cuando la exposición a fotoperiodos es corta, tiene mayor riesgo de presentarlos. La exposición a luz brillante durante la noche afecta directamente el estado de ánimo a través de las proyecciones de las células ganglionares retinales al cerebro, ya que, sin afectar necesariamente la expresión de genes de reloj, se evidencian síntomas depresivos [14].

La terapia de privación del sueño en muchos estudios ha probado que aumenta los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos, se produce un aumento en la actividad neuronal serotoninérgica en el rafe dorsal, aumento de serotonina extracelular y aumento en la capacidad de respuesta con disminución en la sensibilidad de los autorreceptores de serotonina [34]. Un ensayo clínico controlado y aleatorizado [35], donde se evaluaron 42 pacientes con trastorno depresivo mayor, buscando el tiempo de remisión en depresión unipolar con la terapia triple (privación del sueño, terapia de luz brillante y estabilización del sueño) versus un protocolo alternativo que incluía periodos de sueño sin despertar en la noche y exposición a luz brillante con longitudes de onda verdes y azules, encontraron que la tasa de remisión de la semana 1 fue más alta en la terapia triple vs la alternativa sin embargo no fue estadísticamente significativo.

Se deben realizar más estudios para tener una mejor evidencia de la administración de luz en un momento óptimo según el cronotipo de cada paciente esto podría conducir a un tratamiento con mejores resultados. Se deben tener en cuenta la terapia de luz brillante y la privación de sueño sin olvidar que como cualquier intervención también puede tener efectos secundarios, aunque en menor medida que los fármacos [36].

Se ha encontrado además que las personas que padecen síntomas depresivos tienen menos niveles de melatonina a nivel periférico y el periodo de esta es menor entre el sueño y el despertar [37].

Hay una mejoría importante en los pacientes que sufren de depresión tras la administración de medicación que interviene en las alteraciones del ritmo circadiano, con esto podemos inferir que es muy importante la regulación del ritmo circadiano en pacientes con depresión para su adecuado manejo y mejoría en la respuesta al tratamiento [11].

La melatonina es uno de los medicamentos que se proponen para el manejo en alteraciones del ritmo circadiano, puede ayudar a pacientes con alteraciones en el estado del ánimo en diferentes situaciones tales como trastornos del sueño o baja calidad de

este, retraso en la fase del sueño, además de funcionar también para la estabilización del estado del ánimo en fases agudas o remitidas [38].

La serotonina está implicada en diferentes procesos fisiológicos como el ciclo sueño -vigilia, apetito, agresión, comportamiento sexual, dolor, aprendizaje entre otros y además está relacionado con la etiología del Trastorno depresivo mayor desde 1950, la alteración de los niveles de serotonina está asociado a alteraciones en los ritmos circadianos, endocrinos y conductuales [39]; encontramos entonces dentro de los fármacos serotoninérgicos que afectan el sistema circadiano los inhibidores de la monoaminooxidasa, tricíclicos, los inhibidores de la recaptación de serotonina, siendo estos primera línea para tratamiento del trastorno depresivo mayor [39].

Al vernos enfrentados a la administración de medicamentos antidepresivos identificamos algunas desventajas como lo son su largo tiempo de respuesta a la medicación, y efectos secundarios (36), en la búsqueda de manejos alternativos encontramos como la cronoterapia no farmacológica tiene una gran ventaja como lo es la disminución de estos efectos secundarios, pero también tiene desventajas que deben ser consideradas [36].

Manía

La manía tiende a asociarse con cronotipos tempranos, es decir aquellos que tienen una mayor exposición de luz durante el día. No se conoce claramente cuál es el mecanismo por el cual se inducen los cambios maníacos, sin embargo, se ha encontrado que la terapia de privación de la luz en estos pacientes genera disminución de síntomas maníacos [4, 40].

Se cree que la exposición constante a fotoperiodos altera los circuitos cerebrales y causa cambios en la amplitud del ritmo circadiano y, por otro lado, también altera la neurotransmisión de las monoaminas, lo que explicaría los cambios de la conducta maníaca [4]. Sin embargo, también hay una asociación genética que da lugar a la presentación clínica. Por ejemplo, las variaciones en polimorfismos, expresión de genes como CLOCK, Glur6, GSK3, expresión de proteínas *Per* y *Cry*, desencadenan cambios comportamentales [41].

Esto explica que el trastorno bipolar más que un trastorno del estado de ánimo es un complejo cognitivo- conductual en el cual se presentan componentes genéticos y epigenéticos que influyen en el complejo CLOCK, afectando el reloj circadiano [4, 41].

Los enfoques terapéuticos en pacientes con trastornos del estado del ánimo con mejores resultados son aquellos que impactan en los ritmos circadianos. Las técnicas no farmacológicas como terapias de luz, deprivación de sueño, pueden ser de gran ayuda en casos en los que la medicación trae muchas contraindicaciones como en pacientes con insuficiencia hepática y renal avanzada, periodo postparto [42].

La melatonina es una hormona natural de los mamíferos secretada por la glándula pineal durante la noche, las alteraciones en la secreción de melatonina en el TAB se evidencian con secreción máxima tardía, amplitud de secreción reducida y mayor sensibilidad a la supresión de la luz [43].

Esquizofrenia

La esquizofrenia aparte de tener un importante componente genético, con una heredabilidad del 80%, se presenta también por la influencia de factores ambientales como los nutricionales o modificaciones epigenéticas [14].

Se ha encontrado que las alteraciones del patrón circadiano son mayores por ejemplo en pacientes con esquizofrenia, donde esta desregulación produce cambios severos en el ciclo de secreción de la melatonina [41]. Un estudio evaluó 21 genes relacionados con el ciclo circadiano donde al menos 4 genes (ROR, PER2, PER3 y PAS2) presentaron polimorfismos de un solo nucleótido en pacientes con esquizofrenia. También se ha evaluado la expresión de CRY1 y Per2 con una disminución del ritmo de expresión mientras que el gen BMAL1 y el complejo REV-ERBa se encuentran sobre expresados [14].

En un estudio observacional [41] se evaluó la prevalencia de alucinaciones auditivas según la hora del día, y se encontró que son más frecuentes en horas de la noche entre las 6 y 9 pm con un adecuado bloqueo del receptor D2 con el uso de antipsicóticos atípicos (risperidona, olanzapina y paliperidona). Según el artículo se relaciona este patrón circadiano con la ritmicidad de la función dopaminérgica, donde el ácido homovanílico, un metabolito de la dopamina, alcanza los picos máximos entre la medianoche y las 5 am [44], es decir que los picos máximos de dopamina se presentan en horas de la noche, lo que explica estos resultados [45].

También la dopamina se libera más en condiciones de oscuridad en el cuerpo estriado y núcleo accumbens [46]. Todos estos factores influencian el patrón circadiano de los síntomas positivos en pacientes con esquizofrenia. Esto refuerza que la cronofarmacología es importante ya que administrando antipsicóticos en horas de la noche, favorece significativamente a los pacientes para disminuir la presentación de síntomas [45].

Enfermedades Neurodegenerativas

Los pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada a enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, presentan con frecuencia alteraciones en el ciclo sueño vigilia, ritmos hormonales y regulación de la temperatura, lo cual se exacerba en adultos mayores. La evidencia muestra además que en la etapa preclínica de la enfermedad de Alzheimer, demencias relacionadas y enfermedad de Parkinson se ven alteraciones en el ciclo circadiano. Las

alteraciones en el ritmo circadiano pueden ser un objetivo terapéutico prometedor para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [47].

La EP es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la presencia de síntomas motores como temblor en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural. Fisiopatológicamente se evidencia la presencia de cuerpos de Lewy en el locus coeruleus, núcleos del rafe, núcleo de Meynert, núcleo motor dorsal del nervio vago, corteza cerebral, bulbo olfatorio y el sistema nervioso autónomo [15].

En la EP existen numerosas alteraciones en el ritmo circadiano, que incluyen la pérdida de este [48], pérdida de ritmo circadiano de la presión arterial, con variabilidad en la presión diurna, la alteración en el patrón del sueño progresa al tiempo con la enfermedad [48]. Comúnmente se asocia la EP con el déficit dopaminérgico en la vía nigroestriada que se proyecta al núcleo putamen.

La dopamina juega un papel importante en la adaptación a la luz de la retina y regula la expresión periódica de melanopsina [15]. La relación entre dopamina y ciclos circadianos también se ve influida por los genes de reloj ya que CLOCK regula la actividad dopaminérgica en el área tegmental ventral.

Los pacientes con EP regularmente registran menos síntomas motores en horas de la mañana y van empeorando durante la tarde y noche [15]. Es por esto que la administración de los anti parkinsonianos debería ser en horas de la mañana en aras de disminuir la presentación de síntomas en la tarde y noche. La terapia farmacológica en la EP debe tener en cuenta el momento de administración del fármaco para poder tener los beneficios de la cronoterapia.

Insomnio

El insomnio es de los síntomas con mayor prevalencia en todos los trastornos psiquiátricos 30% [19]. Los trastornos del sueño no son nuevos y al contrario vienen en aumento con el mayor uso de pantallas y ahora con el trabajo en casa podemos ver cómo se alteran los patrones de sueño, sin dejar de lado aquellas personas que laboran en horas de la noche; estas disfunciones aunque pudieran ser pequeñas en el reloj biológico pueden tener un impacto amplio en la fisiología del cuerpo y alteraciones en las diferentes fases del sueño, para tratar estas alteraciones se han utilizado medicamentos cronobióticos como la melatonina la cual se ha demostrado es responsable del ciclo sueño/ vigilia, además de este también se utilizan medicamentos como las benzodiacepinas e hipnóticos de tipo Z [10].

Los procesos más importantes en el ritmo circadiano se rigen por el núcleo supraquiasmático, este reloj circadiano va a tener respuesta a diferentes influencias neuroquími-

cas como lo son el glutamato y el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria, melatonina, neuropéptido Y. Las alteraciones sostenidas en el ritmo circadiano pueden producir diferentes patologías como depresión, insomnio, problemas cardíacos, cáncer y muerte prematura [2]. La mayoría de las alteraciones del ritmo circadiano repercuten sobre el patrón del sueño, sin embargo, estudios en especies nocturnas indican que no es una causa directa [14].

Se ha evidenciado que las dosis de benzodiacepinas alcanzan una mayor concentración en horas de la mañana comparada con aplicaciones en la tarde-noche, y las dosis de BZP pueden alterar la cognición en mayor porcentaje si es aplicado en la noche que si se aplicara en la mañana, por otro lado, los fármacos Z, como el zolpidem no cambian el ritmo circadiano en hormonas como el cortisol, la melatonina o la prolactina [2].

La melatonina es una hormona producida en la glándula pineal, la cual comienza a aumentar de manera constante de las 21 a las 23 horas, alcanzando su pico a las 2 y 4 horas, sus niveles más bajos se alcanzan durante el día, es por esto que la melatonina administrada de manera exógena se administra para mejorar los patrones del sueño alterados [2].

La Asociación Británica de Psicofarmacología, basada en consenso y evidencias, recomienda la melatonina como primera línea para alteraciones en el patrón del sueño, en mayores de 55 años, disminuyendo el uso de BZP que puede tener mayores efectos adversos que la melatonina [10].

Trastornos de la alimentación:

Existe una alta prevalencia de trastornos en el ritmo circadiano en pacientes que padecen trastornos alimentarios, se han encontrado anomalías en hormonas que controlan la ingesta de alimentos asociadas a trastornos del ritmo circadiano, pero se necesitan realizar más estudios con poblaciones más robustas para esclarecer el rol de los ritmos biológicos en estas enfermedades y poder abordar un tratamiento coadyuvante para un mejor desenlace [49].

Trastorno de Déficit de atención e hiperactividad:

En el trastorno por déficit de atención e hiperactividad se encuentra asociado en un 73–78% a alteraciones en el patrón de sueño de los pacientes que pueden contribuir a la gravedad de los síntomas en el TDAH (50), la melatonina es segura y eficaz como cronoterapia, para mejoría en el patrón de sueño con inicios más tempranos y mejor calidad de sueño, ciclos de sueño más cortos se asocian a deterioro en la atención y funcionamiento ejecutivo, hacer intervenciones en pro de la mejoría del sueño beneficia la reducción de los síntomas de TDAH [50].

Conclusiones

La raza humana está regida por ritmos biológicos que deben permanecer en equilibrio, dentro del cual nos llama la atención los ritmos circadianos, desde el punto de vista clínico tienen una gran importancia ya que se han venido estudiando para diferentes patologías, estos ritmos circadianos son una fuente de información para lograr intervenir de manera apropiada dependiendo la patología que se quiera intervenir de manera benéfica logrando de nuevo el equilibrio. Tenemos literatura que nos habla de la cronofarmacología en diferentes patologías, pero quisimos enfocarnos en la cronofarmacología en psiquiatría, ya que vemos como varias enfermedades mentales se ven afectadas con las alteraciones en los ciclos circadianos, de esto logramos entender que con un conocimiento de la cronofarmacología se puede optimizar el manejo a los pacientes, mejorando la eficacia de los medicamentos y disminuyendo los efectos adversos los cuales tienen gran dificultad en psiquiatría donde se ve la falta de adherencia a la medicación con mayor prevalencia que en otras patologías. Adicional a esto se encontró también relación con la importancia de la educación no solo del personal de salud sino de familiares y pacientes a la hora de administración de medicamentos ya que la farmacocinética se ve interferida por los ritmos biológicos. Se espera que esta revisión sea una motivación para nuevas investigaciones en el país sobre la administración de medicamentos, ritmos biológicos y su importancia clínica.

Conflicto de intereses

No se declararon conflictos de intereses entre los autores.

Referencias

1. M. Ángeles-Castellanos, K. Rodríguez, R. Salgado, C. Escobar, Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos, *Rev. Fac. Med. UNAM*, **50**(6), 238-241 (2007).

2. N.F.W. Zaki, M. Yousif, A.S. BaHammam, D.W. Spence, V.K. Bharti, P. Subramanian, S.R. Pandi-Perumal, Chronotherapeutics: Recognizing the importance of timing factors in the treatment of disease and sleep disorders, *Clin. Neuropharmacol.*, **42**, 80-87 (2019).

3. M. Toledo. M. Penengo, J.P. García, Psiquiatría y evidencia: lecciones de la pandemia, *Rev. Psiquiatr. Urug.*, **84**(2), 130-132 (2020).

4. A. Hühne, D.K. Welsh, D. Landgraf, Prospects for circadian treatment of mood disorders, *Ann. Med.*, **50**(8), 637-654 (2018).

5. G. Tamosiunas, M. Toledo. La cronofarmacología: un nuevo aspecto a considerar en la variabilidad de la respuesta terapéutica, *Arch. Med. Interna*, **XXXII**(4), 65-69 (2010).

6. A. Hernández-Chávez, *Farmacología general. Una guía de estudio*, McGraw Hill Education, México, 2014.

7. J. Torales, I. Barrios, L. Armoa, El *delirium*: una actualización para internistas y psiquiatras, *Rev. Virtual Soc. Parag. Med. Int.*, **4**(2), 54-64 (2017).

8. S.S. Kirlioglu, Y.H. Balcioglu, Chronobiology revisited in psychiatric disorders: From a translational perspective, *Psychiatry Investig.*, **17**, 725-743 (2020).

9. T.A. Steele, E.K. St Louis, A. Videnovic, R.R. Auger, Circadian rhythm sleep-wake disorders: A contemporary review of neurobiology, treatment, and dysregulation in neurodegenerative disease, *Neurotherapeutics*, **18**, 53-74 (2021).

10. D.A. Golombek, S.R. Pandi-Perumal, G.M. Brown, D.P. Cardinali, Some implications of melatonin use in chronopharmacology of insomnia, *Eur. J. Pharmacol.*, **762**, 42-48 (2015).

11. V. Soria, M. Urretavizcaya, Circadian rhythms and depression, *Actas Esp. Psiquiatr.*, **37**(4), 222-232 (2009).

12. M. Korman, D. Palm, A. Uzoni, F. Faltraco, O. Tucha, J. Thome, A.N. Coogan, ADHD 24/7: Circadian clock genes, chronotherapy and sleep/wake cycle insufficiencies in ADHD, *World J. Biol. Psychiatry*, **21**(3), 156-171 (2020).

13. F. Halberg, G. Cornélissen, G. Katinas, E.V. Syutkina, R.B. Sothern, R. Zaslavskaya, F. Halberg, Y. Watanabe, O. Schwartzkopff, K. Otsuka, R. Tarquini, P. Frederico, J. Siggelova, Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s, *J. Circadian Rhythms*, **1**, 2 (2003).

14. W. H. Walker, J. C. Walton, A. C. DeVries, R. J. Nelson, Circadian rhythm disruption and mental health, *Transl. Psychiatry*, **10**, 28 (2020).

15. S. Nibourg, *Is chronotherapy effective for Parkinson's Disease?* B.Sc. thesis, University of Groningen, Groningen, the Netherlands, 2014, 17 p.

16. D.P. Cardinali, G.M. Brown, R.J. Reiter, S.R. Pandi-Perumal, Elderly as a high-risk group during COVID-19 pandemic: Effect of circadian misalignment, sleep dysregulation and melatonin administration, *Sleep Vigil.*, **4**, 81-87 (2020).

17. M. Gratacós, *Melatonina: estructura química, funciones y usos*, Lifeder, 2020, URL: https://www.lifeder.com/melatonina/

18. P.F. Innominato, F.A. Lévi, G.A. Bjarnason, Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 979-1001 (2010).

19. A. Charrier, B. Olliac, P. Roubertoux, S. Tordjman, Clock genes and altered sleep-wake rhythms: Their role in the development of psychiatric disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(5), 938 (2017).

20. N.F.W. Zaki, D.W. Spence, P. Subramanian, V.K. Bharti, R. Karthikeyan, A.S. BaHammam, S.R. Pandi-Perumal, Basic chronobiology: What do sleep physicians need to know? *Sleep Sci.*, **13**(4), 256-266 (2020).

21. S. Khan, P. Duan, L. Yao, H. Hou, Shiftwork-mediated disruptions of circadian rhythms and sleep homeostasis cause serious health problems, *Int. J. Genomics*, **2018**, 8576890 (2018).

22. J.A. González-Pliego, Desencadenantes de síndromes coronarios agudos. Relaciones fisiopatológicas, *Arch. Cardiol. Méx.*, **76**, 208-221 (2006).

23. E. Ortiz-Tuleda, A. Rol, J.A. Madrid, Ritmos biológicos, cáncer y cronoterapia, *Revista Eubacteria*, **33**, 49-52 (2015).

24. M.C. Mormont, F. Levi, Cancer chronotherapy: Principles, applications, and perspectives. *Cancer*, **97**, 155-169 (2003).

25. T. Furuhata, M. Kawakami, K. Okita, Y. Kimura, C. Kihara, T. Tsuruma, T. Ohmura, K. Yamaguchi, F. Hata, T. Katsuramaki, K. Sasaki, K. Hirata, Plasma level of a 5-fluorouracil metabolite, fluoro-beta-alanine correlates with dihydropyrimidine dehydrogenase activity of peripheral blood mononuclear cells in 5-fluorouracil treated patients, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **25**, 79-82 (2006).

26. F. Lévi, Circadian chronotherapy for human cancers, *Lancet Oncol.*, **2**, 307-315 (2001).

27. S. Sengupta, T.G. Brooks, G.R. Grant, G.A. FitzGerald, Accounting for time: Circadian rhythms in the time of COVID-19, *J. Biol. Rhythms.*, **36**, 4-8 (2021).

28. R. Luther, A. McLeod, The effect of chronotherapy on *delirium* in critical care - a systematic review, *Nurs. Crit. Care*, **23**, 283-290 (2018).

29. American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*, 5th ed., Washington, D.C., 2013, 947 p.

30. J.R. Maldonado, *Delirium* pathophysiology: An updated hypothesis of the etiology of acute brain failure, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **33**, 1428-1457 (2018).

31. Y. Guo, L. Sun, L. Li, P. Jia, J. Zhang, H. Jiang, W. Jiang, Impact of multicomponent, nonpharmacologic interventions on perioperative cortisol and melatonin levels and postoperative *delirium* in elderly oral cancer patients, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **62**, 112-117 (2016).

32. A. Johnsson, W. Engelmann, B. Pflug, W. Klemke, Influence of lithium ions on human circadian rhythms, *Z. Naturforsch C Biosci.*, **35**, 503-507 (1980).

33. A. Wirz-Justice, Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors, *Prog. Neurobiol.*, **29**(3), 219-259 (1987).

34. F. Benedetti, B. Barbini, C. Colombo, E. Smeraldi, Chronotherapeutics in a psychiatric ward, *Sleep Med. Rev.*, **11**, 509-522 (2007).

35. L.D. Yuen, Y. Chen, J.W. Stewart, P. Arden, D.J. Hellerstein, A randomized, controlled trial assessing the acute efficacy of triple chronotherapy in unipolar depression, *J. Affect. Disord.*, **282**, 1143-1152 (2021).

36. J.E.A. Cunningham, J.A. Stamp, C.M. Shapiro, Sleep and major depressive disorder: A review of non-pharmacological chronotherapeutic treatments for unipolar depression, *Sleep Med.*, **61**, 6-18 (2019).

37. L.D. Asarnow, A.M. Soehner, A.G. Harvey, Circadian rhythms and psychiatric illness, *Curr. Opin. Psychiatry*, **26**, 566-571 (2013).

38. P.A. Geoffroy, L. Palagini, Biological rhythms and chronotherapeutics in depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **106**, 110158 (2021).

39. R.A. Daut, L.K. Fonken, Circadian regulation of depression: A role for serotonin, *Front. Neuroendocrinol.*, **54**, 100746 (2019).

40. B. Barbini, F. Benedetti, C. Colombo, D. Dotoli, A. Bernasconi, M. Cigala-Fulgosi, M. Florita, E. Smeraldi, Dark therapy for mania: A pilot study, *Bipolar Disord.*, **7**(1), 98-101 (2005).

41. E. Tarragón, M. Miquel, El Trastorno pipolar: ¿Un trastorno de la regulación circadiana? *Revista eNeurobiología*, **2**(2), 031011 (2011).

42. O. Çalıyurt, Role of chronobiology as a transdisciplinary field of research: Its applications in treating mood disorders, *Balkan Med. J.*, **34**, 514-521 (2017).

43. J. F. Gottlieb, F. Benedetti, P.A. Geoffroy, T.E.G. Henriksen, R.W. Lam, G. Murray, J. Phelps, D. Sit, H.A. Swartz, M. Crowe, *et al.*, The chronotherapeutic treatment of bipolar disorders: A systematic review and practice recommendations from the ISBD task force on chronotherapy and chronobiology, *Bipolar Disord.*, **21**, 741-773 (2019).

44. A. R. Doran, R. Labarca, O.M. Wolkowitz, A. Roy, P. Douillet, D. Pickar, Circadian variation of plasma homovanillic acid levels is attenuated by fluphenazine in patients with schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry*, **47**(6), 558-563 (1990).

45. T. Koizumi, T. Suzuki, N.S. Pillai, R.R. Bies, H. Takeuchi, K. Yoshimura, M. Mimura, H. Uchida, Circadian patterns of hallucinatory experiences in patients with schizophrenia: Potentials for chrono-pharmacology, *J. Psychiatr. Res.*, **117**, 1-6 (2019).

46. T.R. Castañeda, B.M. de Prado, D. Prieto, F. Mora, Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light, *J. Pineal Res.*, **36**, 177-185 (2004).

47. Y. Leng, E.S. Musiek, K. Hu, F.P. Cappuccio, K. Yaffe, Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases, *Lancet Neurol.*, **18**, 307-318 (2019).

48. B. Bruguerolle, N. Simon, Biologic rhythms and Parkinson's disease: A chronopharmacologic approach to considering fluctuations in function, *Clin. Neuropharmacol.*, **25**, 194-201 (2002).

49. G. Menculini, F. Brufani, V. Del Bello, P. Moretti, A. Tortorella, Circadian rhythms disruptions and eating disorders: Clinical impact and possible psychopathological correlates, *Psychiatr. Danub.*, **31**, 497-502 (2019).

50. D. Bijlenga, M.A. Vollebregt, J.J.S. Kooij, M. Arns, The role of the circadian system in the etiology and pathophysiology of ADHD: time to redefine ADHD? *Atten. Defic. Hyperact. Disord.*, **11**, 5-19 (2019).

Cómo citar este artículo

P.S. Moreno-Castro, P.A. Sánchez-Correa, Á. Vallejos-Narváez, Cronofarmacología de los psicofármacos: Revisión de tema, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 356-380 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.93531

Artigo de pesquisa cientifica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109390*

Efeitos sobre funções cognitivas, analgésicos e ansiolíticos de medicamentos homeopáticos e da 7-epiclusianona em um modelo experimental de camundongos *Swiss*

Luis F. C. dos Reis[1a], Alexsander G. R. Ribeiro[1b], Flávia S. I. França[1c], Cláudio Daniel Cerdeira[2d*], Marcelo H. dos Santos[3e], Marcos J. Marques[1f], Aline P. Castro[1g]

[1]Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Departmento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Alfenas, MG, Brasil.

[2]Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Departamento de Bioquímica (DBq), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Alfenas, MG, Brasil.

[3]Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, MG, Brasil.

*Autor de correspondência: daniel.cerdeira.84@gmail.com,

Correios electronicos:

[a] luis.cunha7697@gmail.com, [b] alexsandergrr1@gmail.com, [c] flaviasifranca@gmail.com,

[d] daniel.cerdeira.84@gmail.com, [e] marceloh.santos@ufv.br, [f] marcos.marques@unifal-mg.edu.br,

[g] aline.castro@unifal-mg.edu.br

Recebido: 21 de abril de 2022

Revisado: 6 de fevereiro de 2023

Aceto: 13 de fevereiro de 2023

Resumo

Contextualização: o consumo exacerbado de analgésicos e ansiolíticos vêm se tornando uma grande preocupação mundial e, no Brasil, isso não é diferente, constituindo um sério problema de saúde pública. **Objetivos**: este estudo testou dois complexos homeopáticos e um produto natural paras as atividades analgésica, ansiolítica, e sobre as funções cognitiva. **Metodologia**: foram utilizados 40 camundongos *Swiss*, recebendo dieta padrão e água *ad libitum*, igualmente divididos em 5 grupos: i. Grupo do Complexo Homeopático (H1), cuja constituição e potências são, *Ignathia amara* L. 6CH, Phosphorus 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH, *Valeriana officinalis* L. 6CH *e Gelsemium sempervirens* L. 6 CH; ii. Grupo do Complexo Homeopático (H2), cuja constituição e potências são, *Arnica montana* L. 6CH,

Rhus toxicodendum L. 6CH*, Atropa belladonna* L. 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH*,* Symphytum officinale L. 6CH *e Hypericum perforatum* 6CH; iii. Grupo da 7-epiclusianona (7-EPI) (150mg/kg, 60 min antes); iv. Grupo da Indometacina (GI, 10mg/kg, 60 min antes); e v. Grupo Controle (GC, placebo -salina). Os tratamentos com os complexos homeopáticos foram feitos por 14 dias. Os seguintes testes foram performados: Teste de *Hot Plate* (efeito analgésico); Teste de Campo Aberto (efeito ansiolítico); Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) Novo (capacidade cognitiva), sendo todos filmados, e analisados estatisticamente. **Resultados**: houve um significativo efeito em grooming entre os grupos H1, H2 e 7-EPI, comparados ao GC ($p < 0,05$), demonstrando seus efeitos ansiolíticos, e um significativo efeito no tempo de latência entre os grupos H2, 7-EPI e GI ($p < 0,05$), comparados ao GC, demonstrando analgesia. As substâncias testadas não demonstraram ter significativo efeito no teste de exploraçãodo objeto novo, portanto não interferindo na capacidade cognitiva dos camundongos. **Conclusão**: houve consideráveis efeitos analgésico (H1, H2 e 7-EPI) e ansiolítico (H2 e 7-EPI), sendo que tais compostos positivamente não interferiram na função cognitiva dos camundongos.

Palavras-chave: Analgesia, ansiolíticos, complexos homeopáticos, 7-epi, capacidade cognitiva.

SUMMARY

Effects of homeopathic medicines and 7-epiclusianone on cognitive, analgesic and anxiolytic functions in an experimental *Swiss* mice model

Background: the exacerbated consumption of analgesics and anxiolytics has become a major concern worldwide and, in Brazil, this is no different, constituting a serious public health problem. **Objectives**: this study tested two homeopathic complexes and a natural product for analgesic, anxiolytic, and cognitive functions. **Methodology**: 40 Swiss mice were used, receiving standard diet and water *ad libitum*, equally divided into 5 groups: i. Homeopathic Complex Group (H1), whose constitution and potencies are, *Ignathia amara* L. 6CH*,* Phosphorus 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH*, Valeriana officinalis* L. 6CH *e Gelsemium sempervirens* L. 6CH; ii. Group of the Homeopathic Complex (H2), whose constitution and potencies are, *Arnica montana* L. 6CH, *Rhus toxicodendum* L. 6CH*, Atropa belladonna* L. 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH*,* Symphytum officinale L. 6CH *e Hypericum perforatum* 6CH; iii. 7-epiclusianone (7-EPI) group (150mg/kg, 60 min before); iv.

Indomethacin Group (IG, 10mg/kg, 60 min before); and v. Control Group (CG, placebo -saline). Treatments with homeopathic complexes were carried out for 14 days. The following tests were performed: *Hot Plate* Test (analgesic effect); Open Field Test (anxiolytic effect); Novel Object Recognition (NOR) task (cognitive ability), all being filmed and statistically analyzed. **Results**: there was a significant effect on grooming between groups H1, H2 and 7-EPI, compared to CG ($p < 0.05$), demonstrating its anxiolytic effects, and a significant effect on latency time between groups H2, 7-EPI and IG ($p < 0.05$), compared to CG, demonstrating analgesia. The substances tested did not demonstrate a significant effect in the exploration test of the new object, therefore not interfering with the cognitive ability of the mice. **Conclusion**: there were considerable analgesic (H1, H2 and 7-EPI) and anxiolytic (H2 and 7-EPI) effects, and these compounds, positively, did not interfere with the cognitive function of mice.

Keywords: Analgesia, anxiolytics, homeopathic complexes, 7-epi, cognitive capacity.

RESUMEN

Efectos sobre las funciones cognitivas, analgésicas y ansiolíticas de los medicamentos homeopáticos y la 7-epiclusianona en un modelo experimental de ratón *Swiss*

Fundamento: el consumo exacerbado de analgésicos y ansiolíticos se ha convertido en una gran preocupación a nivel mundial y, en Brasil, esto no es diferente, constituyendo un grave problema de salud pública. **Objetivos**: este estudio probó dos complejos homeopáticos y un producto natural para funciones analgésicas, ansiolíticas y cognitivas. **Metodología**: se utilizaron 40 ratones Swiss, recibiendo dieta estándar y agua *ad libitum*, igualmente divididos en 5 grupos: i. Grupo Complejo Homeopático (H1), cuya constitución y potencias son, *Ignathia amara* L. 6CH, Phosphorus 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH, *Valeriana officinalis* L. 6CH *e Gelsemium sempervirens* L. 6CH; ii. Grupo del Complejo Homeopático (H2), cuya constitución y potencias son *Arnica montana* L. 6CH, *Rhus toxicodendum* L. 6CH, *Atropa belladonna* L. 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH, Symphytum officinale L. 6CH *e Hypericum perforatum* 6CH; iii. Grupo 7-epiclusianona (7-EPI) (150 mg/kg, 60 min antes); iv. Grupo Indometacina (GI, 10 mg/kg, 60 min antes); y v. Grupo Control (GC, placebo-solución salina). Se realizaron tratamientos con complejos homeopáticos durante 14 días. Se realizaron las siguientes pruebas: Prueba de placa caliente (efecto analgésico); Prueba de campo abierto (efecto ansiolítico); Nuevo

Test de Reconocimiento de Objetos (capacidad cognitiva), todo ello filmado y analizado estadísticamente. **Resultados**: hubo un efecto significativo sobre el aseo entre los grupos H1, H2 y 7-EPI, en comparación con GC ($p < 0,05$), demostrando sus efectos ansiolíticos, y un efecto significativo sobre el tiempo de latencia entre los grupos H2, 7-EPI y GI ($p < 0,05$), en comparación con GC, demostrando analgesia. Las sustancias probadas no demostraron un efecto significativo en la prueba de exploración del nuevo objeto, por lo que no interfirieron con la capacidad cognitiva de los ratones. **Conclusión**: hubo considerables efectos analgésicos (H1, H2 y 7-EPI) y ansiolíticos (H2 y 7-EPI), y estos compuestos no interfirieron positivamente con la función cognitiva de los ratones.

Palabra clave: Analgesia, ansiolíticos, complejos homeopáticos, 7-epi, habilidad cognitiva.

INTRODUÇÃO

Os analgésicos têm seu papel no tratamento das dores agudas e crônicas, contudo, é sabido que, mundialmente, há um consumo abusivo desses medicamentos [1]. Ainda há poucos dados na literatura brasileira que demonstrem o perfil de analgésicos consumidos pelo país, porém alguns estudos ilustram o excesso no uso desta classe terapêutica e de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Dipirona, paracetamol e AINES estão entre os fármacos mais utilizados [2-5].

O uso abusivo e prolongado de analgésicos é um dos fatores que desencadeiam a dor crônica, pois há alívio da dor sem obtenção da cura. Com o tempo, a utilização contínua pode se tornar um vício, principalmente quando se trata de opioides [1, 3]. Isso é capaz de gerar tolerância, síndrome de abstinência e dependência nos usuários. Os AINES, podem causar disfunções cerebrovasculares, renais, hepáticas, cardiovasculares, trombóticas, gastrintestinais, gestacionais e fetais, elevando o índice de morbimortalidade [6].

Semelhante aoque ocorre com os analgésicos, os ansiolíticos também geram grande preocupação em relação a utilização excessiva, uma vez que o uso abusivo também pode resultar na manifestação de efeitos adversos graves bem como dependência química dos pacientes [7, 8]. Os representantes mais comuns dos ansiolíticos são os benzodiazepínicos, os quais fazem parte dos principais protocolos de tratamento da ansiedade [9]. O abuso na utilização de ansiolíticos tem causa multifatorial. Pode ser por automedicação, erros de prescrição, dependência ou até mesmo aumento da enfermidade que gera a necessidade do uso desses medicamentos [10].

Também muito comum na sociedade moderna, temos o consumo cada vez mais popular de medicamentos fitoterápicos e homeopáticos. Desse modo, vem surgindo um grande interesse na obtenção de novas substâncias com características naturais e que apresentem eficácia quando o assunto é novos medicamentos para promover analgesia e efeitos anti-ansiedade, com destaque para os fitoterápicos, os medicamentos homeopáticos e as substâncias isoladas de produtos naturais. Neste sentido, a biodiversidade brasileira constitui uma enorme variedade a ser explorada na busca de substâncias com potencial farmacológico, incluindo as espécies vegetais, entre estas, algumas das que estão presentes nos complexos homeopáticos avaliados no presente estudo, os Complexos Homeopático 1 (H1) e o 2 (H2) (tabela 1). Assim, esse estudo procurou evidenciar o efeito analgésico e ansiolítico da 7-epiclusianona (7-EPI), substância extraída e isolada de *Garcinia brasiliensis,* e de dois complexos homeopáticos, o Complexo Homeopático 1 (H1) e o Complexo Homeopático 2 (H2).

Materiais e métodos

Aspectos éticos

Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as recomendações do *National Institutes of Health* [36]. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da UNIFAL-MG (CEUA/UNIFAL-MG), parecer número 0003/2021.

Este estudo não envolve qualquer espécie vegetal ameaçada de extinção e/ou protegida e nenhuma permissão específica foi requerida quanto ao uso do material vegetal.

Preparo das amostras testadas

Complexo Homeopático

Os complexos homeopáticos foram obtidos da farmácia de manipulação ‘’Musgo”, localizada no sul de MG. O critério de escolha para montagem dos complexos homeopáticos foi por essas substâncias possuírem estudos de patogenesia e uso clínico atual. A constituição de cada complexo homeopático é apresentada na tabela 2.

7-Epiclusianona (7-EPI)

Para obtenção da 7-EPI (IUPAC, 3-benzoil-4-hidroxi6,6-dimetil-1,5,7-tris(3-metil-but-2-en-1-il)biciclo[3.3.1]non-3- ene-2,9diona) foi usado o epicarpo das sementes dos frutos de *G. brasiliensis*. Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45’ 14”sul e longitude 42° 52’ 55” oeste). A identificação botânica foi realizada por um perito em botânica, no horto botânico da

Tabela 1. Produtos vegetais presentes nos homeopáticos avaliados e fonte de 7-EPI.

Planta	Nome popular	Principais usos/indicações	Principais bioativos	Refs
7-EPI isolada de:				
Garcinia brasiliensis	Bacupari, bacoparé e bacuparí miúdo	Indicações da planta englobam o tratamento de problemas de pele, instestino e controle do metabolismo de lipidios e perda de peso	É uma benzofenona natural poliprenilada, e foi primeiramente isolada dos frutos de *Rheedia brasiliensis*	[11, 12]
Presentes no Complexo Homeopático H1:				
Ignathia amara L.	Fava de Santo Inácio	É um policresto, podendo ser usado apenas na formulação homeopática, a qual é utilizado no tratamento de transtornos do humor como depressão, ansiedade, estresse e até em casos de insônia	Sementes são ricas em tóxicos/venenos como a estricnina e a brucina, dois alcaloides que possuem ação excitatória sobre o SN. Os efeitos tóxicos também estão relacionados a essas duas substâncias.	[13, 14]
Aconitum napelus L.[a]	Acônito, Casca de Júpiter, Capuz de Frade	Tratamento de indivíduos com pavor/ transtorno de pânico, angústia indefinível e medo terrível da morte	Alcaloides aconitina, sendo estes de ação tóxica, além de conter picro-aconitina, napelina, e ácido aconítico	[15-17]
Valeriana officinalis L.	valeriana-selvagem, e valeriana-silvestre	Os extratos de *V. officinalis* exibe um amplo espectro de atividades farmacológicas com ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatório, sedativo, anti-reumático, ansiolítico, tranquilizante, antiespasmódicos, anticonvulsivantes e neuroprotetora	No óleo essencial são encontrados mais de 150 constituintes, como monoterpenos, sesquiterpenos e ácidos carboxílicos, além de aminoácidos, alcaloides (chantinina, valerina, pirrolcetona), flavonoides (linarina, metilapigenina) e linhanos (hidroxipinorresinol). Exibe ação sinérgica, devido a três princípios ativos: Valepotriatos com efeito estabilizante sobre os centros vegetativos e emocionais, restaurando o equilíbrio autônomo-fisiológico; Sesquiterpenos, que inibem a GABA transaminase, aumentando os níveis de GABA no SNC; e Lignanas, um agonista parcial dos receptores de adenosina subtipo A1, responsáveis por induzirem sedação	[18, 19]

(*Continua*)

Planta	Nome popular	Principais usos/indicações	Principais bioativos	Refs
Gelsemium sempervirens L.	Jasmim amarelo e Jasmim da Carolina	Empregado na homeopatia e fitoterapia como relaxante do SN, no tratamento de dores e enfermidades, além de ser útil no tratamento de inquietação, irritabilidade, insônia, dor de cabeça e convulsões. Estudos demonstram seu efeito ansiolítico ao utilizar baixíssimas doses em medicamentos homeopáticos, com ação sedativa e sobre a pressão arterial, no tratamento de infecções bacterianas	Contêm o princípio ativo gelsemina, juntamente com outros relacionados à estricnina, como a sempervirina, sendo os alcaloides, os principais fitoconstituintes	[20-22]
Presentes no Complexo Homeopático H2:				
Arnica montana L.	Arnica, arnica vulgar, arnica da montanha, arnica do mato, arnica do campo e erva lanceta	Considerada como perigosa pelo FDA, devido a toxicidade, mas utilizada em medicamentos homeopáticos, com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobiana, antiparasitária, antirreumática e anti-hemorrágica, tratamento da epilepsia e tontura	Flavonoides, ácidos fenólicos, óleos essenciais e terpenos, com ação farmacológica relacionada com a presença de lactonas sesquiterpênicas (helanalina e dihidro- helanalina), as quais promovem inibição de NF-KB	[23, 24]
Rhus toxicodendum L.	Carvalho venenoso	Em geral, é venenosa, mas usada moderadamente em homeopatia em tintura mãe, obtida com suas folhas verdes, para pacientes com inquietude, ansiedade de consciência e que chora facilmente	Ácido tânico, ácido toxicodêndrico, óleos voláteis e resinas	[25-28]

(*Continua*)

Planta	Nome popular	Principais usos/indicações	Principais bioativos	Refs
Atropa belladonna L.	Cereja-da-loucura, beladona, beladama	Correção da bradicardia provocada por drogas colinérgicas. Apesar de muito tóxica, na forma homeopática, menos tóxica, tem ação antimicrobiana (*Streptococcus pyogenes*); além de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, neurofarmacológica, anticolinérgica e acaricidas	Entre os princípios ativo tóxicos, estão os alcaloides tropânicos (atropina e escopolamina). A atropina presente na Belladona provoca o bloqueio vagal muscarínico M1 e M2	[29-32]
Symphytum officinale L.	Confrei ou consolida	A medicação homeopática é a única forma permitida na administração via oral do confrei, uma vez que se utiliza pequenas doses da substância, preparada em altas diluições e dinamizada. Indicada no tratamento de consolidação de fraturas e doenças ósseas	Tóxica devido aos alcaloides. Indicação terapêutica é baseada na presença de alantoína, taninos e mucilagens, sendo estes mais concentrados nas raízes	[33]
Hypericum perforatum L.	Hipérico, orelha de gato, alecrim bravo, arruda de São Paulo, arruda do campo, Erva de São João	Tratamento e prevenção de diversas doenças devido aos seus efeitos nefroprotetores, atividades antioxidante, antifúngica, ansiolítica, antiviral, cicatrizante, antitumoral e anti-inflamatória, destaque no tratamento de depressão unipolar leve e moderada	Possui compostos biologicamente ativos que atuam como Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), um exemplo é a hiperforina	[34, 35]

[a]Também presente no Complexo Homeopático H2; Observação: muitas das plantas e/ou seus bioativos apresentados são tóxicas/venenosa, podendo ser usadas apenas em codições específicas nas formulações homeopáticas preparadas por um profissional farmacêutico. SN: sistema nervoso ; SNC: sistema nervoso central

Universidade Federal de Viçosa. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da referida Universidade.

Os epicarpos dos frutos de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40 ºC durante 8 dias com monitoramento de perda de água. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas, fornecendo 1000 g e submetido à extração por remaceração em 1000 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente. Foram filtrados e secos usando um rotavapor à pressão reduzida. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes.

Para isolar a 7-EPI o extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi cromatografado em colunas de sílica gel (CC) (230-400 mesh) (8 × 100 cm) e eluída com misturas de polaridade crescente de hexano/acetato de etila e acetato de etila/etanol sendo as frações concentradas em rotavapor à pressão reduzida. Estas frações foram reunidas em grupos de acordo com suas semelhanças após a análise por cromatografia em camada fina (TLC). Quando necessário, foram recromatografadas e, ou recristalizadas em metanol para obtenção do composto puro, cujos padrões foram usados para sua identificação além dos dados espectrais [11, 37]. A pureza da 7-EPI (99%) foi determinada (Shimadzu UFLC 20), usando uma coluna NST (Nano Separation Technologies) C18–154605 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B). O volume de injeção foi de 20,0 μL e fluxo de 1,0 mL/min. Durante os 10 minutos iniciais a análise foi realizada com 50,0% de B, em seguida a concentração de B aumentou linearmente até 100,0% em 20 min e seguiu 100,0% de B até 30 min. Depois a concentração de B foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise. Os cromatogramas foram obtidos em 254 nm e seus picos foram comparados com padrões previamente isolados no laboratório.

Indometacina

A Indometacina foi obtida da SM Empreendedorismo farmacêutico – LTDA, Alfenas-MG.

Ensaios com os animais

Desenho experimental

Foram utilizados 40 camundongos machos, da espécie *Swiss*, pesando em média 25 g com 8 semanas de idade, aclimatados conforme descrito na literatuta [38] e, mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*, para testar o efeito analgésico, ansiolítico e a influência na capacidade cognitiva das substâncias em questão. Cada camundongo passou apenas uma vez pelos teste de Campo aberto, *Hot plate*, e Teste/tarefa de reco-

nhecimento de objetos (TRO), para se evitar viéses de repetição, sendo feita a seguinte divisão dos camundongos em grupo conforme mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Grupos experimentais

Grupo	Descrição	Administração/dose/rota/período	Animais (n)
GC	Grupo controle – placebo	Água administrada durante 2 semanas	8
GI	Grupo controle – Indometacina	Administração de indometacina, por gavagem, 10 mg/kg em solução de carboximetilcelulose (q.s.p. 1%), 60 min antes dos testes.	8
7-EPI	Grupo tratado - 7-epiclusianona	Administração de 7- EPI, 150 mg/kg em solução de carboximetilcelulose (q.s.p. 1%), por gavagem, 60 min antes dos testes.	8
H1	Grupo tratado – complexo homeopático H1	Administração diária durante 2 semanas, junto a água de consumo[1], do complexo Homeopático (H1): *Ignathia amara* L. 6CH[2], Phosphorus 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH, Valeriana officinalis L. 6Ch *e* Gelsemium sempervirens L. 6 CH.	8
H2	Grupo tratado – complexo homeopático H2	Administração diária durante 2 semanas, junto a água de consumo, do complexo Homeopático (H2): *Arnica montana* L. 6CH, *Rhus toxicodendum* L. 6CH, *Atropa belladonna* L. 6CH, *Aconitum napelus* L. 6CH, Symphytum officinale L. 6CH *e Hypericum perforatum* 6CH.	8

Nota: [1] Suspensão/solução: 60 gotas/L, o consumo pelos grupos foi monitorado e registrado diariamente (informado na seção **Resultados**). [2]CH (diluição centesimal Hahnemanniana) indicam as potencias.

Avaliação dos compostos em promover analgesia, e efeitos ansiolíticos e sobre a cognição dos camundongos

Teste do Campo Aberto

Para este teste, os camundongos foram testados separadamente, ou seja, um por vez, em um campo aberto com dimensões de 40 × 40 × 50 cm, e quadrantes com dimensão 5 × 5 cm. O experimento foi realizado após às 17 horas, em um ambiente com luz e ruídos controlados. Cada experimento foi gravado pelo experimentador utilizando uma câmera digital, colocada de modo em que não estivesse no campo de visão dos camundongos. Cada animal foi testado durante 5 minutos, e através das filmagens, que se inicia com o animal no centro da área determinada, foi possível analisar o número de quadrantes percorridos por minuto, quantidade de movimentos verticais bipodais

(Rearing), autolimpeza (Grooming) e tempo de permanência na área central, para a determinação das atividades locomotora e exploratória [38].

Teste da placa quente (Hot Plate)

Para avaliação da nocicepção utilizou-se o teste *Hot Plate* com algumas modificações [39]. Os camundongos foram retidos, um por vez, na superfície aquecida de um béquer de 1000 mL, com temperatura mantida a 50-52 °C. O teste foi gravado por uma câmera digital, e posteriormente os vídeos foram analisados, observando o tempo de latência para o comportamento de dor, caracterizado como os primeiros sinais de desconforto, em que se pode ter a lambida das patas, levantamento da pata traseira, ou pelo movimento de tremores vigorosos "shaking" em uma destas patas [40].

Teste/tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) novo para investigação de aprendizagem e memória em camundongos

O teste foi realizado em três sessões: uma sessão de habituação, uma sessão de treinamento e outra de teste. Foram utilizadas peças de LEGO, para realização do teste. Cada animal foi habituado na arena do teste durante 5 minutos e em seguida, ao ambiente de realização do teste, durante 2 horas. Logo após, foi realizada a etapa de treinamento, no qual os animais foram colocados na arena do campo aberto durante 5 minutos. Após 24 horas, foi realizada a sessão teste, na qual um dos objetos idênticos foi removido e substituído no mesmo local por outro objeto (objeto novo), possuindo as mesmas dimensões, mas com forma e cor diferente. Nenhuma pista visual foi encorajada na sala experimental a ser usada como referência espacial, a sala estava vazia ao máximo possível para a execução do teste, incluindo ausência de fita sobre a parede do aparato, nem objetos deliberadamente colocados ao seu redor [41].

O experimento foi filmado através de uma câmera digital, de modo que o observador e o equipamento, não ficassem no campo de visão dos camundongos. Para análise, a exploração do objeto foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteira. Andar em torno do objeto não foi considerado comportamento exploratório [42]. O tempo de exploração foi expresso em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos, permitindo determinar a razão de discriminação a partir da proporção de tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar. O reconhecimento de objeto foi distinguido pelo animal em passar mais tempo explorando o objeto novo, indicado pelo valor do índice de discriminação maior que 0,5.

Análise dos dados

Após constatação de normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) seguida de teste para comparação múltipla de médias

(Tukey), com médias sendo consideradas estatisticamente diferentes e significativas quando p foi < 0,05.

Resultados

Primeiramente, os consumos dos complexos homeopáticos H1 e H2 foram monitorados, sendo no grupo H1, 3,14 mL/10 g e, no grupo H2, 3,18 mL/10 g. Não houve diferença estatística significativa entre estes grupos.

Atividade ansiolítica – testes do campo aberto

O parâmetro *grooming* (figura 1) apresentou efeito estatístico significante (p < 0,05) entre os grupos H1, H2 e 7-EPI, quando comparados com o grupo Controle. Além disso, houve ainda diferença significativa entre os grupos H1 e H2 em relação a Indometacina. No entanto, as variáveis tempo de centro, *rearing* e número de quadrantes (figura 1: A, B, C e D, respectivamente) não apresentaram efeito significativo entre os grupos analisados (H1, H2, 7-EPI e Indometacina) quando comparados com o grupo Controle.

Atividade analgésica (antinociceptiva)–*Hot plate*

O parâmetro tempo de latência (figura 2) apresentou resultado estatisticamente significativo (p < 0,05) entre os grupos H2, 7-EPI e Indometacina, quando comparados com o grupo Controle.

Efeito sobre a cognição-TRO novo

Não houve efeito significativo no tempo de exploração do objeto novo entre os grupos analisados (H1, H2, 7-EPI, e Indometacina) quando comparados com o grupo Controle (figura 3, A). A relação entre o tempo de interação com o objeto familiar e o novo também não apresentou diferença entre os grupos analisados (figura 3, B).

Discussão

No presente estudo, a influência de duas formulações homeopáticas (H1 e H2) e do composto natural isolado 7-EPI foi investigada quanto aos possíveis efeitos analgésico, ansiolítico e sobre a função cognitiva em camundongos. Em virtude do amplo uso na sociedade atual, nós avaliamos algumas formulações homeopáticas. Proposta em 1796 pelo médico alemão Cristiano Frederico Samuel Hahnnemann, a homeopatia foi introduzida no Brasil em 1840 através do médico francês Benoit Jules Mures. Ao contrário da medicina alopática que se baseia na cura pelo contrário, a homeopatia, atua curando pelo princípio da similitude e os medicamentos homeopáticos são cons-

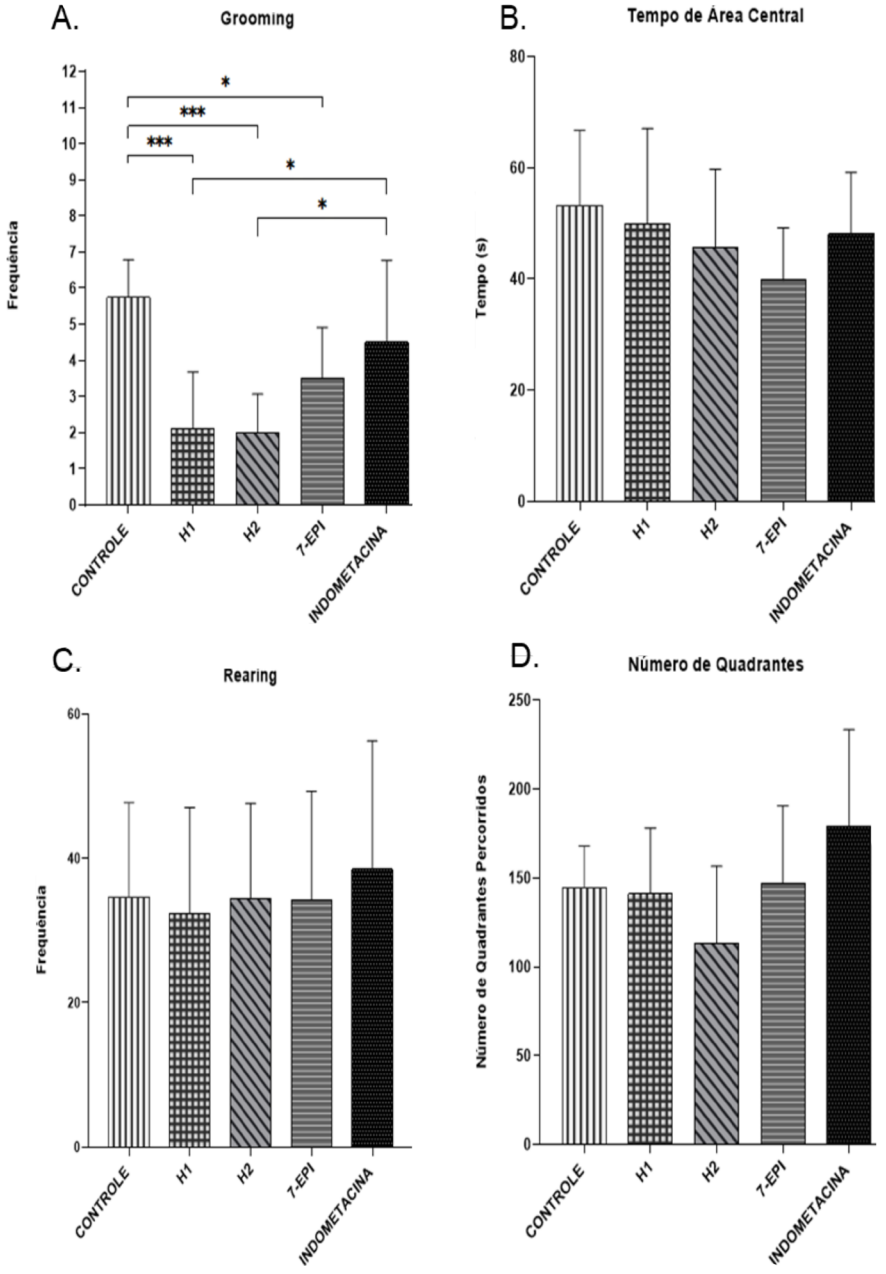


Figura 1. Efeitos dos complexos homeopáticos e 7-EPI sobre o comportamento locomotor e exploratório (ansiedade) em camundongos. Nota: A, B, C e D: Parâmetros analisados no Campo Aberto. (A) Frequência de Grooming; (B) Tempo de permanência na Área Central; (C) Frequência de Rearing e (D) Número de Quadrantes percorridos.

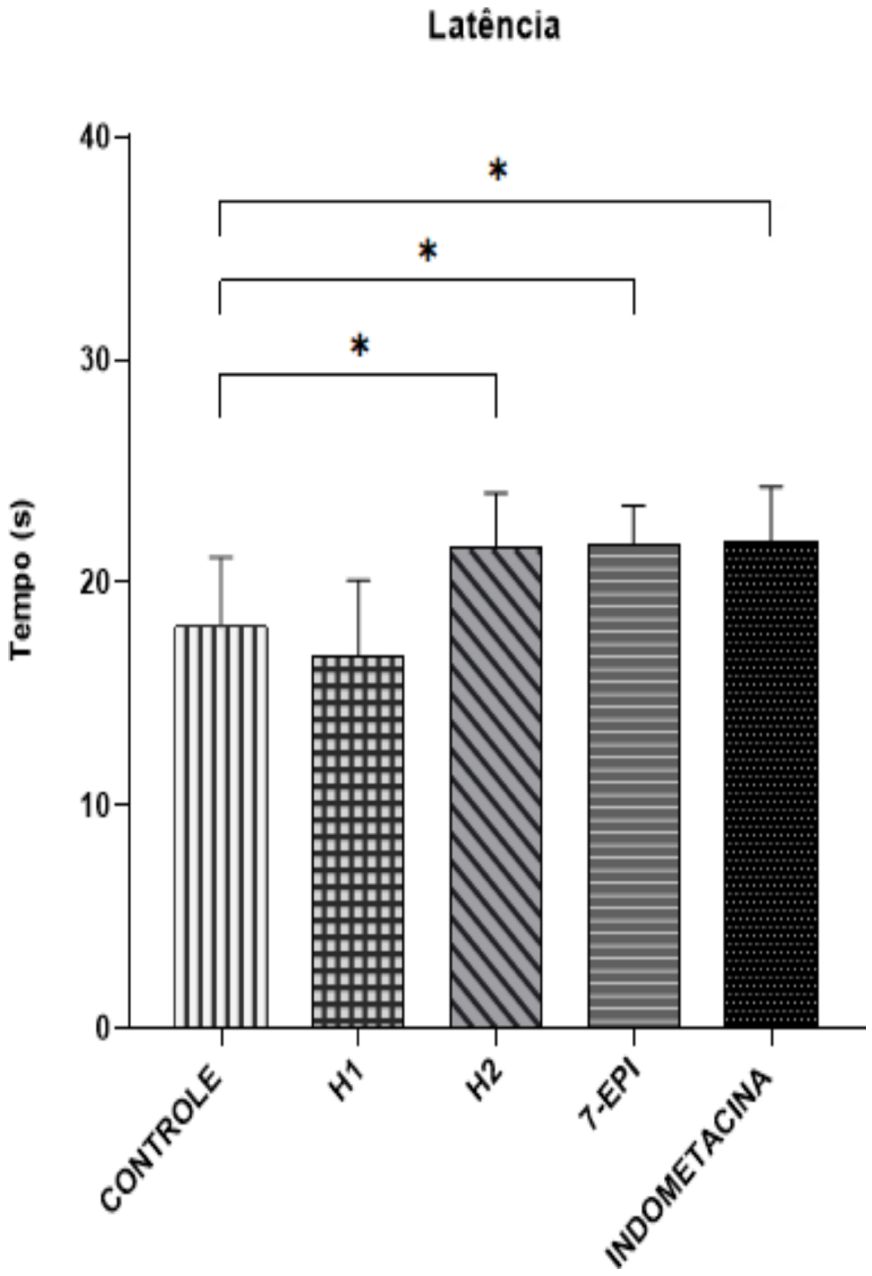


Figura 2. Efeitos dos complexos homeopáticos e 7-EPI sobre a resposta a dor (ansiedade) em camundongos. Nota: Tempo de Latência para retirada da pata no teste *Hot Plate*.

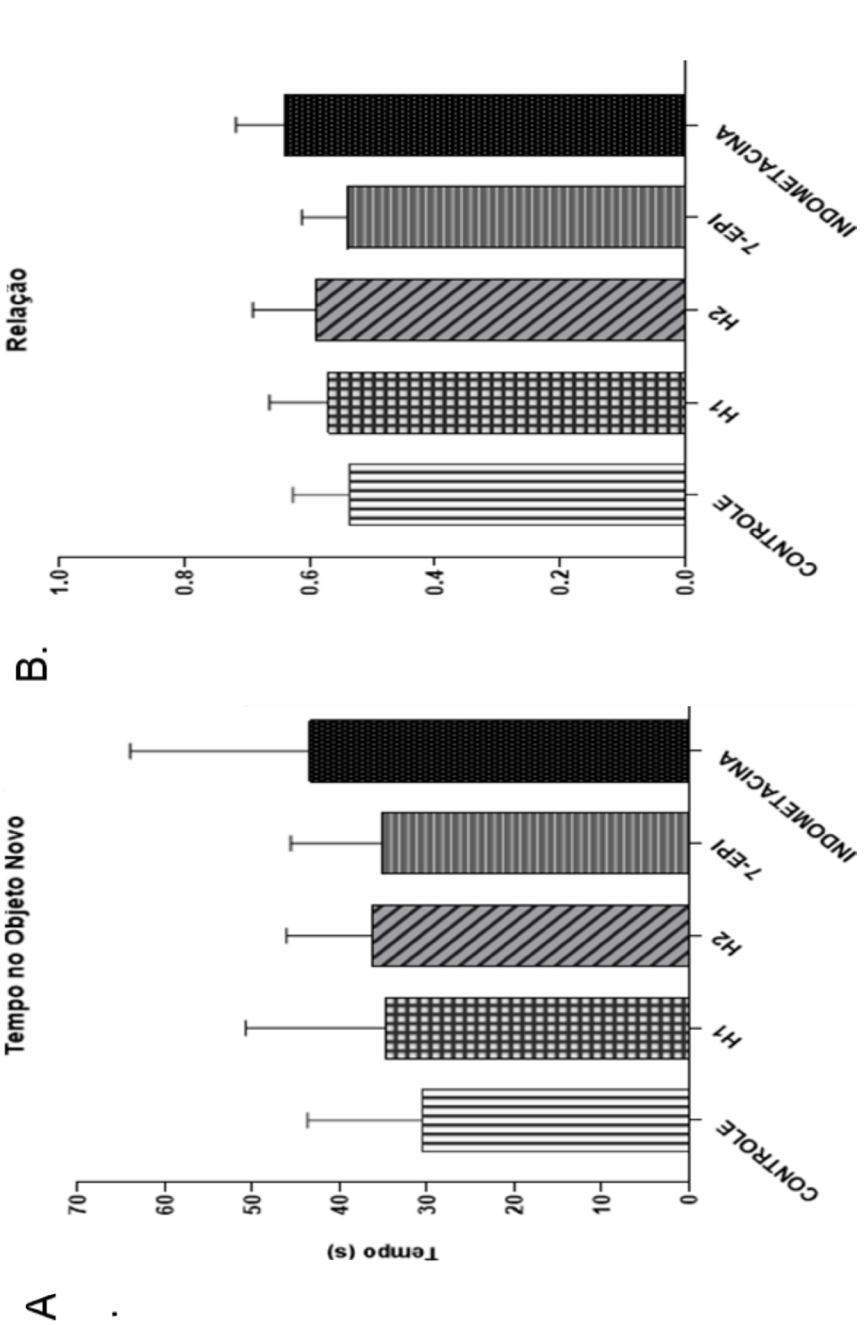


Figura 3. Efeitos dos complexos homeopáticos e 7-EPI sobre a cognição de camundongos. **Nota:** Parâmetros Tempo que os camundongos passaram explorando o objeto novo (A) e Relação entre o tempo de interação com o objeto familiar e o novo (B).

tituídos de doses bem diluídas, por isso muitos cientistas acreditam que a homeopatia viola as leis naturais, logo, os efeitos observados equivalem a um efeito placebo [43].

O teste do Campo Aberto é amplamente utilizado para avaliação da atividade locomotora espontânea e fornece informações sobre o estado de emocionalidade dos roedores [44]. Os parâmetros analisados neste estudo foram: Grooming, tempo de permanência no centro, número de rearing/levantamentos e número de cruzamentos. O grooming é uma atividade característica de autolimpeza, que os animais realizam, principalmente, para higienização da superfície corporal [45]. Desse modo, pode aumentar quando o animal se apresenta tranquilo [46]. Contudo, esse comportamento é sensível aos níveis de estresse e, a exposição à novidade, como por exemplo, introdução a um ambiente novo, aumenta a frequência de grooming [47], por isso não pode ser utilizado isoladamente como indicativo de ansiedade [46]. Aqui, o parâmetro grooming (figura 1 A) gerou resultados estatisticamente significativos dos grupos H1, H2 e 7-EPI quando comparados com o grupo Controle. Os animais do grupo Controle (GC) apresentaram frequência maior na realização de grooming em relação aos outros grupos analisados. Ao observar a figura 1, é possível notar que os grupos H1 e H2 realizaram o grooming menos vezes que os demais, indicando possível efeito ansiolítico dessas substâncias. Houve ainda diferença significativa entre os grupos H1 e H2 em relação ao grupo Indometacina, o qual apresentou frequência de grooming próxima ao do grupo Controle. No grupo tratado com 7-EPI, apesar de apresentar valores maiores que H1 e H2, quando comparada com o grupo Controle, obteve resultado significativo, o que sugere também diminuição da ansiedade e medo durante o tempo de exposição na arena do CA.

Um outro parametro avaliado em testes de ansiedade é o tigmotatismo, um comportamento manifestado por ratos e camundongos, no qual a movimentação desses animais se dá perto das paredes do ambiente a que foram submetidos. No CA, eles preferencialmente, passam a maior parte do tempo do teste na periferia da arena [45]. Os animais tendem a evitar os quadrantes da parte central, pois o centro do CA é considerado um local de exposição [48]. O tempo que os camundongos passam no centro da arena em relação ao tempo de periferia, durante a realização do teste, é classificado como uma medida de ansiedade e medo [46]. Não só o tempo na região central, mas o número de vezes que eles entram na área central também pode ser utilizado para mensuração da ansiedade [48]. Não foram observados resultados estatísticos significativos no tempo de centro entre os grupos quando comparados com o grupo Controle (figura 1 B). Era esperado que esse parâmetro tivesse o mesmo padrão de resposta obtida no grooming, porém as médias obtidas no tempo que o animal permaneceu no centro foram muito próximas entre os grupos.

O rearing é um comportamento exploratório gerado pela novidade de um ambiente [49]. Consiste na quantidade de elevação das patas dianteiras sem tocar as paredes do CA [50]. Além da influência ambiental, fatores como idade e genética também podem interferir na expressão desse comportamento [48]. No presente estudo, o número de rearing não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (figura 1 C), sugerindo que não houve alteração na atividade locomotora após administração das substâncias. Apesar dos resultados não se apresentarem significativos, a análise desse parâmetro é indispensável para avaliação da ansiedade dos camundongos, uma vez que ele se relaciona com a tomada de decisão. Quanto maior a frequência de tentativas, maior é a indecisão do animal, o que reflete em um nível maior de ansiedade [49]. Alguns autores sugerem que o rearing tem a função de ampliar e atualizar informações sobre o ambiente durante a exploração. Além disso, esse comportamento exploratório também é importante na procura de alimentos, proteção contra predadores e busca de acasalamento, sendo considerado como um mecanismo de sobrevivência e adaptação dos animais [48].

Outro parâmetro que avalia a atividade locomotora dos roedores é o número de quadrantes que eles atravessam durante a realização do teste [46]. É considerado como uma medida de exploração e emocionalidade. A frequência de cruzamentos pode ser relacionada inversamente com o estado de ansiedade e medo do animal, ou seja, quanto menos cruzamentos, maior é o medo e ansiedade apresentada por ele. Logo, os animais mais ansiosos tendem a explorar menos o CA [45]. Mais uma vez não houve diferença significativa entre os grupos analisados quando comparados com o grupo Controle em relação ao número de cruzamento das marcações do CA (figura 1 D). Isso sugere que não houve prejuízo na atividade locomotora, mesmo após a administração dos medicamentos. Além da influência na atividade locomotora e exploratória dos camundongos no Campo Aberto, a redução no número de cruzamentos pode detectar efeito sedativo relacionado a administração de altas doses de certas substâncias [51]. Apesar de haver muitos estudos que definem a distância percorrida no CA como um comportamento de exploração ambiental, alguns autores questionam essa classificação e apontam que o animal pode estar, por exemplo, tentando escapar do ambiente novo ou procurando comida, ao invés de estar explorando [48].

O teste *Hot Plate* é utilizado para medir analgesia através do tempo em que os camundongos conseguem ficar sem demonstrar sinais de dor, que é evidenciada pela nocicepção térmica manifestada pelo reflexo de retirada da pata [52]. Ao analisar os testes de *Hot Plate*, foi possível notar resultados significativos ao comparar o tempo que os camundongos ficaram sem realizar o movimento de retirada de pata (figura 2). Aqueles animais que receberam o Complexo Homeopático 2, 7-EPI, e a Indometacina, permaneceram mais tempo sem reagir a dor, quando comparados ao tempo dos animais

do grupo Controle, sugerindo que estas substâncias apresentam atividade analgésica *in vivo*. Por outro lado, o grupo do Complexo Homeopático 1 não demonstrou ter tal atividade, uma vez que este grupo teve uma média de tempo muito próxima do grupo controle, e diferença significativa dos demais grupos. O resultado do teste para a Indometacina (controle), já era esperado, uma vez que a mesma possui, comprovadamente, potente atividade analgésica e anti- inflamatória, inibindo a transmissão nociceptiva, além da prevenção do edema e da inflamação [53], sendo frequentemente utilizada no tratamento de dor, artrites, distúrbios musculoesqueléticos agudos, lombalgias, etc. [54]. Assim, a mesma foi testada neste estudo, como um controle positivo, no intuito de comparar os resultados dos outros compostos com sua atividade. O que tornou os resultados ainda mais complementares, uma vez que a média de tempo dos grupos H2 e 7-EPI é muito próxima ao tempo dos animais do grupo da Indometacina, com a média de tempo de 21,51; 21,71 e 21,86; respectivamente, demonstrando ter níveis de atividades semelhantes.

O TRO Novo para investigação de aprendizagem e memória foi realizado com intuito de analisar se essas substâncias influenciam na capacidade de aprendizagem, uma vez que alguns ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, podem induzir a prejuízos persistentes nas funções cognitivas, e psicomotoras, mesmo em baixas doses [55], levando a diminuição da atenção que, consequentemente, pode aumentar o risco de acidentes com automóveis, prejuízos na memória e desinibição paradoxal. O TRO, foi originalmente descrito por Ennaceur e Delacour em 1988, é um ensaio comportamental relativamente rápido, eficiente, e simples, utilizado para avaliar o aprendizado e a memória de ratos e camundongos [56]. Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, naturalmente eles passam maior porção do tempo explorando o novo objeto, através deste típico comportamento é possível realizar uma avaliação comportamental [42], com intuito de investigar aspectos de aprendizagem e memória. A partir dos resultados, foi observado que a média do índice de discriminação foi maior que 0,5 para todos os grupos analisados, inclusive o Controle, indicando que os camundongos passaram a maior parte do tempo de exploração no objeto novo (figura 3). Isso demonstra que, de modo geral, os animais testados foram capazes de reconhecer o objeto familiar através de sua memória [57].

Entretanto, existem variáveis que podem influenciar os resultados do TRO, como por exemplo, o estado de tensão dos camundongos, que afeta não só no tempo de exploração, mas também no intervalo de retenção (período de retenção de informação que ocorre logo após o treinamento, e os animais são postos novamente em sua gaiola). Algumas espécies de camundongos possuem naturalmente níveis mais elevados de ansiedade, o que também poderia potencialmente impactar na atividade locomotora e/ou tempo de exploração, e uma vez que este é diminuído, pode distorcer ou mascarar

os resultados em uma análise de discriminação absoluta [56]. Dessa forma, é plausível sugerir que o teste seja refeito, aumentando o número de exposições ou a duração da exposição à arena antes do treinamento, a fim de auxiliar a diminuir a ansiedade e encorajar a exploração. Não foi considerado que os camundongos sentiram ansiedade ou estresse causados por um estressor na sala de habitação, uma vez que na mesma não havia ruídos, odores significantes, ou temperaturas extremas. Outro fator de influência envolve a escolha dos objetos, que podem simplesmente ter gerado desinteresse dos camundongos, assim é importante avaliar cuidadosamente os objetos usados no ensaio, podendo ser previamente testados antes da realização de um novo experimento, com intuito de se descartar qualquer preferência de objeto [56].

Com relação a escolha dos complexos homeopáticos e 7-EPI, nós levamos em conta o uso popular dos constituintes (produtos naturais/plantas) dos complexos homeopáticos e da planta que origina a 7-EPI, a *G. brasiliensis*. Tais plantas e seus bioativos são amplamente descritos na literaturas (tabela 2), apesar de que quando em associação em complexo homeopáticos seus reiais papeis passam a ser complexos e pouco conhecidos, não se descartando o efeito sinérgico ou outros tipos de interações (inclusive, antagonismo). A escolha dos compostos do Complexo Homeopático 2, foi feita propositalmente com o intuito de testar sua atividade analgésica, assim todos os componentes que a constitui possui na literatura atividade analgésica ou anti- inflamatória, sendo já utilizados na homeopatia no auxílio de dores e processos inflamatórios. Contudo, não foram encontrados na literatura outros estudos que analisassem sua atividade *in vivo*.

A 7-EPI demonstrou, no presente estudo, ter atividade analgésica, assim como em um prévio trabalho [11], em que a 7-EPI diminuiu o tempo de lambedura causado por uma injeção sub plantar de formalina. Além disso o teste da placa quente produziu um aumento significativo na reação de latência, demonstrando um efeito antinociceptivo", confirmando o uso tradicional desta espécie para tratamento de dores e inflamações. O teste da placa quente mostra a resposta do animal frente a um estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central, além de medir uma resposta complexa a um nociceptivo agudo e não inflamatório [58], por consequência é um teste muito sensível aos analgésicos que atuam em nível central. Nesse teste, o estímulo térmico ativo os nociceptores (fibras C não mielinizadas) que transmitem a informação para regiões específicas no SNC produzindo uma resposta nociceptiva organizada [59]. Assim, ao comparar os resultados com um prévio estudo [11], que afirma a atividade da 7-EPI no SNC, através dos resultados obtidos no teste da placa quente, é possível confirmar que a 7-EPI atua pelo menos no sistema nervoso central, esta substância também pode ter atividade antinociceptiva periférica, contudo é necessário realizar outros testes para identificá-la, e também para investigar seu mecanismo de atuação a nível molecular e sua participação nos mecanismos inibidores da dor do SNC.

Como limitações deste estudo, a utilização de apenas 8 animais para cada grupo, pode ter colaborado para alguns resultados não significantes, uma vez que é recomendado que os grupos tenham 15-20 animais a fim de se obter resultados mais fidedignos [56]. Contudo, pode se citar que estes são testes relativamente simples, rápido, fácil e pouco estressante aos camundongos, o que pode ser útil em estudos preliminares e de triagens, como um primeiro passo robusto na identificação de mudanças cognitivas ou uma ferramenta primária para análise de analgesia e efeitos ansiolíticos [56].

Conclusão

Em um modelo experimental de camundongos *Swiss*, houve consideráveis efeitos analgésico (H1, H2 e 7-EPI) e ansiolítico (H2 e 7-EPI) para os complexos homeopáticos testados (H1 e H2) e o composto natural isolado 7-EPI, sendo que tais compostos positivamente não interferiram na função cognitiva dos camundongos, não havendo influência significativa no TRO, o que permite afirmar que as substâncias não interferiram na capacidade de aprendizado dos camundongos. Contudo, seria importante, novos estudos explorando outras metodolgias para constatar tais achados, e cabe ressaltar a complexidade na composição destes complexos homeopáticos, o que dificulta o entendimento do exato mecanismo de ação durante as bioatividades propiciadas pelos principios ativos vegetais.

Contribuições dos autores:

Participou do preparo do material vegetal/isolamento 7-EPI e/ou parte experimental: LFCR, AGRR, FSIF, MHS; Participou das análises dos dados e escrita do manuscrito na sua forma final: CDC; Participou da elaboração e orientação do trabalho: MJM, APC.

Conflitos de interesse

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

Referências

1. N.B. Vale, Analgesia adjuvante e alternativa, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, Campinas, **56**, 530-555 (2006).

2. G.A.M. Barros, M.A.M. Calonego, R.F. Mendes, *et al.*, Uso de analgésicos e o risco da automedicação em amostra de população urbana: estudo transversal, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **69**, 529-536 (2019).

3. Conselho Federal de Farmácia (CFF), *Uso prolongado de analgésicos traz riscos à saúde*, 2016. [CrossRef].

4. V.M. Borges, F. Moura, C.D. Cerdeira, *et al.*, Uso de medicamentos entre gestantes de um município no sul de Minas Gerais, Brasil, *Infarma*, **30**, 30-43 (2018).

5. C.D. Pinto, N. de Oliveira, R.B.V. Silva, C.D. Cerdeira, *et al.*, Automedicação entre estudantes de enfermagem em uma universidade privada no sul de Minas Gerais, *Research*, *Society and Development*, **10**, e25210817129 (2021).

6. J. M. Silva, P.P. Mendonça, A.K. Partata, Anti-inflamatórios não- esteroides e suas propriedades, *Revista Científica do ITPAC*, **7**, 5 (2014).

7. D.S.S. Azevedo, E.P. Lima, A.A. Assunção, Fatores associados ao uso de medicamentos ansiolíticos entre bombeiros militares, *Revista Brasileira de Epidemiologia*, **22**, E190021 (2019).

8. C.K. Ferraresso, F. Neves, L.E.F. Campos, L.D.M. Vieira, M.P.M. Pereira, C.D. Cerdeira, *et al.*, Assessment of anxiety disorders and use of drugs among academics of medicine at a university in the south of Minas Gerais, Brazil, *Uningá Review Journal*, **36**, eURJ3975 (2021).

9. E.F. Carvalho, *Perfil de dispensação e estratégias para uso racional de psicotrópicos*, 45f. Monografia (Linhas de Cuidado em Enfermagem), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

10. V.R. Fávero, M.O. Sato, R.M. Santiago, Uso de ansioliticos: abuso ou necessidade? *Visão Acadêmica*, **18**, 98-106 (2017).

11. F.V. Santa Cecília, L.A.S. Freitas, F.C. Vilela, C.d.C. Veloso, C.Q da Rocha, M.E.C. Moreira, D.F. Dias, A. Giusti-Paiva, M.H. dos Santos, Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7- epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, *European Journal of Pharmacology*, **670**, 280-285, (2011).

12. M.H. Santos, T.J. Nagen, T.T. Oliveira, *et al.*, 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*, *Química Nova*, **22**, 654-660 (1999).

13. S. Hahnemann, *Matéria Médica Pura*, EHB, São Paulo, 1998.

14. G. Jurj, Loganíaceas: Da toxicologia ao repertório, *Revista de Homeopatia*, **71**, 14-24 (2008).

15. L.F. Filippsen, J.L. Moletta, A.P. Minho, *et al.*, *Aconitum napellus* no pré-abate e seu efeito na qualidade da carne bovina. *Revista de Homeopatia*, **74**, 104 (2011).

16. G.A. Shimizu, Transtorno do pânico: Tratamento homeopático e descrição de caso clínico, *Revista Científica Eletrônica de Psicologia*, **2**, 1-6 (2004).

17. S.O. Wakabara, *Aconitum Nepellus* "é um ciclone de curta duração", Associação Brasileira de Reciclagem e Assistência em Homeopatia, 2005. [CrossRef]

18. S. Golçalves, A.P. Martins, *Valeriana officinalis*, *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, **3**, 209-222 (2005).

19. M.L.P. Pinheiro, *Avaliação dos efeitos da Valeriana officinalis L no controle da ansiedade em pacientes submetidos a exodontias de terceiros molares mandibulares inclusos*, Dissertação (mestrado em odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003, 67 p.

20. D. Olioso, M. Marzotto, E. Moratti, *et al.*, Effects of *Gelsemium sempervirens* L. on pathway-focused gene expression profiling in neuronal cells, *Journal of Ethnopharmacology*, **153**, 535-539 (2014).

21. V. Dutt, S. Thakur, V.J. Dhar, *et al.*, The genus *Gelsemium*: An update, *Pharmacognosy Reviews*, **4**, 185-194 (2010).

22. T.A. Passeti, A.J. Manzoni, L.G. Ambrozino, *et al.*, Ação dos medicamentos homeopáticos *Arnica montana*, *Gelsemium sempervirens*, *Belladonna*, *Mercurius solubillis* e nosódio sobre o crescimento *in vitro* da bactéria *Streptococcus pyogenes*, *Revista de Homeopatia*, **77**, 1-9 (2014).

23. A. K. Schoaba, *Uso de Fitoterapia: Matricaria recutia e Arnica montana no tratamento da dor causadas por inflamação*, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2018, 36 p.

24. J. Waizel-Bucay, M.L. Cruz-Juarez, *Arnica montana* L., planta medicinal europea con relevancia, *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, **5**, 98-109 (2014).

25. I.S. Lima, *Uso da homeopatia nas principais afecções cutâneas causadas por estafilococos: uma revisão*, Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Associação Paulista de Homeopatia, São Paulo, 2017, 78 p.

26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), *Farmacopeia Brasileira*, 2ª Ed., Brasilia, 2019.

27. C.C. Aparicio, C. Carvalho, Redução da incidência da miopatia de esforço (síndrome da rabdomiólise por esforço – SRE) em equídeos na romaria de franco da rocha a aparecida com o uso de *Rhus toxicodendron* 12CH: relato de caso, *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, **16**, 71-72 (2018).

28. M.L.H. de Mello, *Rhus toxicodendron*, Associação brasileira de reciclagem e assistência em homeopatia, 2010. [CrossRef]

29. C.E. Fernández, *Toxicidad de plantas medicinales: Hyosciamus niger, Atropa beladona. Recuperacion de uso, perspectiva terapêutica y toxicológica*, Trabajo fin de grado, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 2016, 19 p.

30. J.J.F. Lima, As plantas na história da dor, *Revista da Sociedade Portuguesa de Anestesiologia*, **22**, 126-133 (2013).

31. D.G. Barg, *Plantas tóxicas*, Trabalho em Metodologia Científica no Curso de Fitoterapia no IBEHE/FACIS, Faculdade de Ciência da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2004, 24 p.

32. N.B. Vale, A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **52**(3), 368-380 (2002).

33. A.P. de Lima, *Efeito do Symphytum officinale L. (confrei) fitoterápico e homeopático na reparação óssea em tíbias de ratos*, Tese (Doutorado em Odontologia), Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José dos Campos, 2012.

34. A.C.S. Alves, D.C Moraes, G.B.L. De Freitas, *et al.*, Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L., *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **16**, 593-606 (2014).

35. A. Nunes, Utilização da planta Erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum* L.) no tratamento de depressão, *Visão Acadêmica*, **19**, 80-93 (2018).

36. National Institutes of Health [NIH], *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,* The National Academy Press, Washington DC, 2011, [PubMed].

37. V.S. Gontijo, T.C. de Souza, I.A. Rosa, *et al.*, Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp, *Food Chemistry*, **132**, 1230-1235 (2012).

38. S.N.P. Lima, C.D. Cerdeira, G.B. Santos, *et al.*, Tempol modulates the leukocyte response to inflammatory stimuli and attenuates endotoxin-induced sickness behaviour in mice, *Archives of Physiology and Biochemistry*, **126**, 341-347 (2018).

39. N.B. Eddy, D. Leimbach, Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl– and dithienylbutylamines, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **107**, 385-393 (1953).

40. M. Rezaee-As, M. Sabour, V. Nikoui, *et al.*, The study of analgesic effects of *Leonurus cardiaca* L. in mice by formal, tail flick and *hot plate* tests, *International Scholarly Research Notices*, **2014**, 687697 (2014).

41. J.C. Szczepanik, *Efeito do metilglioxal sobre o sistema nervoso: Uma investigação neuroquímica e comportamental em camundongos*, Tese (Doutorado em neurociências), Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

42. J.G.P. Cruz, D.D. Dal Magro, J.N. da Cruz, et al., Efeitos da administração aguda de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores, *Revista Eletrônica de Farmácia*, **6**, 123-138 (2009).

43. C. Vanzela, R.M. Bitencourt, Homeopatia: terapia alternativa ou efeito placebo?, *Revista Unoesc & Ciência - ACBS Joaçaba*, **8**, 59-66 (2017).

44. I.L. Cavalcante, *Avaliação comportamental não clínica do metileugenol em modelo de depressão induzida por dexametasona com fêmeas*, 90f. Dissertação (Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamento), Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018, 90 p.

45. B.G.O. Monte, *QLTs Associados com Emocionalidade em Fêmeas Pós- Parto de Camundongos LG/J x SM/J*, Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011, 88 p.

46. D.P. Laureano, *Avaliação do Impacto da Manipulação Neonatal no Comportamento de Ratas Ovariectomizadas*, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem), Escola de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010, 49 p.

47. T.S. Campoli, *Papel do Núcleo Dorsal da Rafe sobre o Comportamento de Grooming Induzido por Novidade em Ratos*, Dissertação (Mestrado em Análise do

Comportamento), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019, 43 p.

48. R. Alves, *Estudo Comportamental, Farmacológico, Bioquímico e Hormonal em Subgrupos de Ratos Selecionados pelo Comportamento de Empinar no Teste do Campo Aberto*, Tese (Doutorado em Ciências), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo (2009), 209 p.

49. T.C. Goes, F.D. Antunes, T.H. Almeida-Souza, *et al.*, Comportamento de ratos Wistar no paradigma da exploração livre, *Revista Scientia Plena*, **9**, 124901 (2014).

50. R.W. Camargo, *Avaliação do p-Cimeno em um Modelo Experimental de Autismos Induzido por Lipopolissacarídeo em ratos Wistar*, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2019, 94 p.

51. S.F. Fortes, *Investigação dos Efeitos Interativos de NAC e Diazepam em Modelos de Ansiedade em Camundongos*, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016, 59 p.

52. J. Cabral-Silva, Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais, *Revista Brasileira de Farmácia*, **94**, 18-23 (2013).

53. E.K.F. Batista, Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **18**, 433-441 (2016).

54. F.F. Santos, Avaliação toxicológica de indometacina incorporada à sílica mesoporosa, *18o Congresso Nacional de Iniciação Científica*, Universidadde Paulista, SEMESP, 2018, 7 p.

55. C. Gorenstein, M.A. Bernik, S. Pompéia, *et al.*, Os benzodiazepínicos sao realmente inócuos? *Revista ABP-APAL*, **15**, 153-154 (1993).

56. L.M. Lueptow, Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice, *Journal of Visualized Experiments*, **126**, e55718 (2017).

57. S.E. Ramos, *Efeito da condição claro/escuro e da intensidade luminosa na aprendizagem e memória de trabalho de camundongos Swiss*, Dissertação (Mestrado em comportamento animal), Programa de Pós-Graduação em ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011, 36 p.

58. A.M. Bhandare, A.D. Kshirsagar, N.S. Vyawahare, *et al.*, Potencial atividade analgésica, antiinflamatória e antioxidante do extrato hidroalcoólico de noz de *Areca catechu* L., *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 3412-3417 (2010).

59. T. Mekonnen, K. Urga, E. Engidawork, Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* Jacq in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **127**, 433-439 (2009).

Como citar este artigo

L.F.C. dos Reis, A.G.R. Ribeiro, F.S.I. França, C.D. Cerdeira, M.H. dos Santos, M.J. Marques, A.P. Castro, Efeitos sobre funções cognitivas, analgésicos e ansiolíticos de medicamentos homeopáticos e da 7-epiclusianona em um modelo experimental de camundongos *Swiss*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 381-406 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109390

Artigo de pesquisa cientifica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102426*

Determinação da atividade antimicrobiana e toxicológica das folhas de *Annona muricata* Linn (graviola)

Jamicelly Rayanna Gomes da Silva [a*], Elayne Rayane Diniz Melo [b], Aurea Juliene Oliveira [c], Juliana Gonçalves Silva [d], Iran Alves da Silva [e], Elder Pedro Nunes de Araujo [f], Larissa Morgana Bezerra da Silva [g], Risonildo Pereira Cordeiro [h]

Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces -Unita), Avenida Portugal, 584, Universitário, Caruaru, Pernambuco, Brasil.

Correios eletrônicos:

[a*] jamicelly.rayanna@gmail.com, [b] 2017106134@app.asces.edu.br,

[c] aureajuliene@gmail.com, [d] juliana.goncalvess@ufpe.com,

[e] iranalvesdasilva0@gmail.com, [f] elderp156@gmail.com,

[g] larissamorganabzz@gmail.com, [h] risonildocordeiro@asces.edu.br

Recebido: 4 de maio de 2022

Revisado: 7 de fevereiro de 2023

Aceto: 14 de fevereiro de 2023

Resumo

Objetivos: determinar a atividade toxicológica e antimicrobiana do Extrato Bruto Seco (EBS) das folhas de *Annona muricata* (L.). **Metodologia:** foi realizado o EBS alcóolico das folhas de *Annona muricata* L. o qual foi submetido à avaliação da toxicidade baseada na concentração letal média (CL_{50}) e na Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE). A atividade antimicrobiana foi analisada por meio do teste de Potencial Inibitório (PI). **Resultados:** o EBS das folhas apresentou atividade frente *S. mutans* em todas as concentrações testadas. A CL_{50} dessa espécie foi de 265, 66 µg/mL. A FOE na concentração de 1000 µg/mL, foi de 31,28% indicando elevada toxicidade. **Conclusão:** Frente ao exposto verificou-se a atividade microbiológica e toxicológica de *Annona muricata* (L.), qual, indicou atividade inibitória frente *S. mutans.* No tocante ao seu potencial toxicológico verificou-se um perfil que pode ser usado, desde que com cautela. Enfatizando a necessidade de novos estudos acerca da temática que possam avir a incluir a planta na prática clínica das comunidades locais.

Palavras chaves: Annona, fitoterapia, toxicologia, microbiologia.

Resumen

Determinación de la actividad antimicrobiana y toxicológica de hojas de *Annona muricata* Linn (guanábana)

Objetivos: determinar la actividad toxicológica y antimicrobiana del Extracto Seco Crudo (EBS) de las hojas de *Annona muricata* (L.). **Metodología:** se realizó el EBS alcohólico de hojas de *Annona muricata* L., el cual fue sometido a la evaluación de toxicidad con base en la concentración letal media (CL_{50}) y en la Fragilidad Osmótica de Eritrocitos (FOE). La actividad antimicrobiana se analizó mediante la prueba de Potencial Inhibitorio (PI). **Resultados:** EBS de hojas mostró actividad contra *S. mutans* en todas las concentraciones probadas. La CL_{50} de esta especie fue de 265,66 µg/mL. El FOE a una concentración de 1000 µg/mL fue de 31,28%, indicando alta toxicidad. **Conclusión:** en vista de lo anterior, se verificó la actividad microbiológica y toxicológica de *Annona muricata* (L.), lo que indicó actividad inhibitoria contra *S. mutans*. En cuanto a su potencial toxicológico, hubo un perfil que se puede utilizar, siempre que se utilice con precaución. Enfatizando la necesidad de más estudios sobre el tema que puedan incluir la planta en la práctica clínica de las comunidades locales.

Palabras clave: Annona, fitoterapia, toxicología, microbiología.

Summary

Determination of antimicrobial and toxicological activity of leaves of *Annona muricata* Linn (soursop)

Objectives: to determine the toxicological and antimicrobial activity of the Crude Dry Extract (EBS) from the leaves of *Annona muricata* (L.). **Methodology:** the alcoholic EBS of *Annona muricata* L. leaves was performed, which was submitted to the evaluation of toxicity based on the mean lethal concentration (LC_{50}) and on the Erythrocyte Osmotic Fragility (FOE). Antimicrobial activity was analyzed using the Inhibitory Potential (IP) test. **Results:** the EBS of the leaves showed activity against *S. mutans* at all concentrations tested. The LC50 of this species was 265.66 µg/mL. The FOE at a concentration of 1000 µg/mL was 31.28%, indicating high toxicity. **Conclusion:** in view of the above, the microbiological and toxicological activity of *Annona muricata* (L.) was verified, which indicated inhibitory activity against *S. mutans.* Regarding its toxicological potential, there was a profile that can be used, provided it is used with caution. Emphasizing the need for further studies on the subject that may include the plant in the clinical practice of local communities.

Keywords: Annona, phytotherapy, toxicology, microbiology.

Introdução

O consumo popular de plantas medicinais e seus derivados como prática terapêutica para saúde tem seus primeiros registros desde o início da civilização humana [1] . Para Viana et al., (2019) [2] este uso iniciou-se através de emplastos, chás, garrafadas e outros métodos que eram viáveis no processo terapêutico. Com isto, os conhecimentos populares acerca das propriedades curativas dos vegetais foram sendo mais evidenciados, utilizados ao passar do tempo e em diferentes culturas [3].

Braga *et al.* (2021) [4] elucidam que na cultura popular o uso de espécies medicinais ocorre de forma retroativa aos hábitos antigos em que é comum a utilização de remédios caseiros à base de plantas. Autores indicam que aproximadamente 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca de alívio para sintomas ou dores, com tal utilização dando-se principalmente por ser de fácil acesso, baixo custo e por serem consideradas inofensivas por grande parte da população [5]. Em vista disso, sabe-se que em certas comunidades, as plantas são a única forma de tratamento de enfermidades [2].

Na procura por novos tratamentos alternativos, foi levantado que *Annona muricata* (L.), popularmente conhecida como graviola, apresenta diversas atividades farmacológicas evidenciadas em estudos *in vivo* e *in vitro* [6]. Nativa das regiões tropicais da América do Sul e do Norte, a infusão das suas folhas é muito empregada para obter efeitos antidiabético, analgésico, anti-inflamatório, antiprotozoário, antioxidante, anticâncer e antitumoral [7]. Além destas ações, autores descrevem preparações, utilizando uma ou mais partes da planta, para tratamento de diferentes doenças, como artrite, hipertensão, sedativo, cistite, dor de cabeça, malária e como antimicrobiano [7].

A Partir de tais pressupostos, ressaltando a necessidade da elaboração de estudos com plantas medicinais, este trabalho teve como finalidade verificar a toxicidade das folhas da espécie *Annona muricata* (L.), (graviola), através de bioensaios toxicológicos utilizando *Artemia salina* Leach e a Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE), assim como a determinação da atividade antimicrobiana da planta frente às cepas de microrganismos.

Metodologia

Tipo de trabalho e amostragem

Esse estudo possui delineamento transversal do tipo laboratorial experimental, realizado nos laboratórios do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita). A seleção das amostras foi por conveniência, considerando-as aptas aquelas que apresentassem aspectos saudáveis, íntegros e excluindo aqueles que apresentassem qualquer

deterioração e/ou ataque de insetos ou fungos. Foram utilizadas 600 g de folhas de *Annona muricata* (L.), identificadas, autenticadas e depositadas no herbário Dárdano de Andrade Lima (Número de tombo 93217). Para os cálculos de seleção amostral, foram acrescidos de 20% objetivando prevenir eventuais perdas oriundas do processo. Esta pesquisa foi realizada de maio a junho de 2019 e a análise dos resultados foi realizada de junho a julho do mesmo ano.

Produção dos extratos brutos de *Annona muricata* (L.)

Para produção dos extratos brutos do espécime, as folhas de *Annona muricata* (L.) foram colhidas pela manhã às 7 h, selecionando amostras com aspectos saudáveis. Em seguida, foram pesadas frescas em balança industrial e lavadas. Posteriormente ocorreu a separação e seleção manual das folhas mais adequadas. As partes vegetais foram secas com papel toalha e colocadas para secar em estufa botânica a 40 ºC até apresentarem aspecto quebradiço. Após esse aspecto, foram trituradas em moinho industrial e maceradas com solução etanólica a 95% (pertencente a empresa Hexis Científica) na proporção de 200 g de material vegetal para 1 L de solução extrativa.

Os balões de fundo chato para maceração foram reservados à sombra, sob temperatura ambiente de 22 ºC, envoltos com papel alumínio e tamponados com algodão hidrofóbico por 7 dias. Após esse procedimento, as soluções passaram por um processo de extrusão e filtração com papel filtro, resultando no Extrato Bruto Fluído.

O Extrato Bruto Fluído teve sua solução etanólica extraída em evaporador rotativo a vácuo sob temperatura de 60 ºC e 60rpm com banho de gelo. Após a evaporação de grande parte da solução (aproximadamente 90%), o extrato teve sua secagem complementada em estufa de ar circulante com temperatura de 50 ºC até apresentar características de uma pasta espessa concentrada, no qual foram armazenados sob refrigeração os então Extratos Brutos Secos (EBS) das folhas de *Annona muricata* (L.)

Determinação da atividade antimicrobiana de *Annona muricata* (L.)

Foram utilizadas cepas selvagens dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus mutans* e *Candida albica*ns. O Potencial Inibitório (PI) foi realizado pela técnica de difusão em poços presente no livro de Diagnóstico microbiológico de Koneman e Allen (2008) [8], analisando a formação ou não de halos inibitórios ao redor dos poços preenchidos com os EBS de *Annona muricata* (L.) no meio Ágar Mueller-Hinton (pertencente a marca KASVI, para bactérias) e Ágar Sabouraud (pertencente a marca KASVI, para fungos) contendo os microrganismos semeados e comparando os resultados com a inibição do antibiótico controle, amoxicilina para bactérias (pertencente a Sigma-Aldrich, com 95% de pureza) e fluconazol para fungos

(pertencente a Sigma-Aldrich, com 98% de pureza). Tal técnica de difusão em poços foi escolhida em razão da presença de partículas em suspensão nos extratos a serem testados e esta metodologia apresentar uma menor probabilidade de ocorrer interferência com a difusão da substância antimicrobiana no ágar que no disco de papel de filtro [9].

As placas foram identificadas com o respectivo nome do microrganismo e inseridos quatro poços de 6mm de diâmetro (utilizando ponteiras de 200-1000 µL) para inserção de 50 µL de extrato diluído em soro fisiológico (concentração de 0,9%, pertencente a marca Needs), com o auxílio de pipeta automática e ponteiras descartáveis em diferentes diluições a partir de 1000 mg/10 mL (solução-matriz), sendo estas: 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL e 6,25 mg/mL. O procedimento foi realizado em duplicata.

As placas foram incubadas em estufa (Microprocessada de Cultura de Bacteriologia Q316M) a 37 ºC por um período de 24 horas e, posteriormente, foi verificado com o auxílio de um paquímetro (série 125) o diâmetro em milímetros dos halos que foram formados ao redor dos poços.

Concentração letal média (CL_{50}) de *Annona muricata* (L.)

A determinação da Concentração Letal Média (CL_{50}) seguiu a metodologia descrita e validada por Meyer *et al.* (1982) [10] onde ovos de *Artemia salina* Leach foram incubados em solução marinha, submetidos a iluminação artificial (lâmpada de 40W) e temperatura constante de 28 ºC por um período de 48 horas. Após este procedimento, obteve-se o estágio de metanáuplio dos microcrustáceos, modelo padrão para testes toxicológicos devido a sua maior sensibilidade.

Foram pesados em um cadinho 50 mg de Extrato Bruto Seco de *Annona muricata* (L.) em uma balança analítica e posteriormente adicionado 1 mL de Tween 80% (pertencente a marca Dinâmica) para auxiliar na solubilização de cada extrato. A solução foi adicionada de água salina com pH de 8, completada para 5 mL e homogeneizado. Posteriormente foram retiradas alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL com o auxílio de pipetas automáticas e transferidas para tubos de ensaio que já continham 5 mL de água salina e 12 metanáuplios, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada amostra.

O teste foi realizado em triplicata e as amostras foram novamente submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de microcrustáceos vivos e mortos, realizada uma porcentagem com os valores obtidos e os dados foram tabulados e analisados no programa computacional Microcal origin 8.0, determinando o valor da atividade toxicológica e um gráfico do teste. Os dados foram transformados por *logit* e o valor final foi derivado de regressão linear,

onde o programa nos forneceu os valores de inclinação representado por "b" e interseção em y (a) e então a CL_{50} foi calculada a partir da seguinte equação: $y=a+bx$.

Fragilidade Osmótica Eritrocitária de *Annona muricata* (L.)

A determinação da fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) objetiva mensurar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, frente a extratos de espécies vegetais, onde a metodologia foi validada por Dacie [11]. Foram utilizados 50 mg do EBS de *Annona muricata* (L.) diluído com soro fisiológico e Tween 80% para auxiliar na solubilização, o EBS das folhas foi homogeneizado e teve seu volume completado para 5 mL.

Dessa solução-matriz foram retiradas alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL com o auxílio de pipetas automáticas e colocadas em tubos de ensaio que já continham 5 mL de soro fisiológico. Após esse procedimento e homogeneização foram adicionados 25 µL de sangue de carneiro e obtidas as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µL/mL, realizando a análise em duplicata.

As amostras foram submetidas à centrifugação de 3300rpm (marca Bioplus, modelo BIO-2000 IL) durante 15 minutos a 22 ºC. Após o processo, a absorbância do sobrenadante de cada amostra localizada no tubo de ensaio foi mensurada em espectrofotômetro a 545 nanômetros. A determinação da FOE do EBS se baseou no valor da absorbância média da hemoglobina do sobrenadante (obtida no espectrofotômetro) multiplicada pelo percentual total (100%) e dividido pelo valor da absorbância média da hemólise completa dos eritrócitos (1,32), conforme descrito na metodologia citada.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram calculados por técnicas estatísticas descritivas através de distribuições absolutas e percentuais. Os *softwares* utilizados foram o Microcal Origin 8.0 e o Microsoft Office Excel 2016.

Resultados e discussão

Determinação da atividade antimicrobiana de *Annona muricata* (L.)

Segundo de Brito *et al.* (2020) [12], a introdução de antibióticos na prática clínica representa um grande avanço na terapia e profilaxia de doenças infecciosas. O estudo de Vieira e Freitas (2021) [13] expõe que tal prática promove o desenvolvimento de uma variabilidade de agentes infecciosos através de um mecanismo de defesa desenvolvido por esses microrganismos, explicando a gênese das bactérias super-resistentes. Desta forma, Rios

(2021) [14] enfatiza a importância do incentivo para pesquisa de novas drogas potenciais antimicrobianas, com eficácia superior aos antibióticos existentes no mercado.

Ao analisar a tabela 1 é possível verificar que os extratos etanólicos de *Annona muricata* (L.) não apresentaram atividade antifúngica frente à *Candida albicans*. No entanto, de acordo com Cesar *et al.* (2021) [15], verificou–se que o extrato metanólico das folhas de graviola apresentou ação inibitória de crescimento sobre as cepas ATCC de *C. albicans* (ATCC 76485), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). Os valores de mensuração dos diâmetros dos halos foram mais significativos nos testes realizados com as espécies de *C. krusei* e *C. albicans* frente aos extratos brutos da folha e do fruto de *A. muricata*, com halos de 30 mm e 22mm respectivamente.

Pai *et al.* (2016) [16], realizou um estudo com o extrato aquoso das folhas de *A. muricata* e obteve resultados promissores contra uma espécie selvagem de *Candida albicans*, exibindo atividade fungicida em todas as concentrações testadas de 10 g em 100 mL com diluições de 1, 5, 10, 15 e 20%. Em concordância com estes dados, Cesar *et al.* (2021) [15] obtiveram resultados promissores com extratos metanólicos das folhas de graviola e elucidaram a atividade antifúngica desta espécie frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC 76485), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803). Nosso estudo não demonstrou atividade antimicrobiana das folhas de *Annona muricata* (L.) contra *C. albicans* possivelmente por utilizar etanol 95% como líquido extrator e os estudos anteriores utilizarem metanol e água, o que indica que substâncias com perfil de polaridade diferentes estavam presentes nos extratos.

Como demonstrado na tabela 1, os extratos das folhas de *Annona muricata* (L.) apresentaram atividade em todas as concentrações testadas frente à cepa selvagem de *Streptococcus mutans*. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com a literatura existente, no qual Pai *et al.* (2016) [16] demonstra que os extratos aquosos da graviola apresentaram eficácia moderada contra diferentes bactérias cariogênicas selvagens como *S. mutans* e *S. mitis*, verificando-se que *S. mutans* demonstrou maior sensibilidade.

Haro *et al.* (2014) [17] ao pesquisarem sobre o extrato metanólico de *Annona muricata* (L.) demonstraram a atividade antibacteriana sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), justificando tal efeito a presença de taninos e flavonoides. Desta forma, tais pesquisadores atribuíram a ação dos taninos presentes no extrato como responsáveis por desfazer a membrana citoplasmática bacteriana através da coagulação de suas proteínas e os flavonoides por romper a permeabilidade da parede celular, caracterizando uma ação sinérgica entre os componentes.

No nosso estudo observou-se que o extrato das folhas de *Annona muricata* (L.) contra *Staphylococcus aureus* selvagem não apresentou inibição em nenhuma das concentrações testadas. Ao analisar a literatura, Batista *et al.* (2021) [18], demonstraram que o extrato metanólico das folhas de graviola apresentou ação frente a cepa de *S. aureus (*ATCC 25923) formando um halo equivalente a 11 mm.

Por fim, os microrganismos da espécie *Streptococcus agalactiae* fazem parte da microbiota humana, estando presentes nos tratos geniturinário e gastrintestinal [19]. De acordo com a tabela 1, o EBS das folhas de *Annona muricata* (L.) não demonstrou atividade antibacteriana frente à espécie selvagem de *S. agalactiae.* Embora não tenha demonstrado grande atividade antibacteriana nesse estudo, de acordo com Batista *et al.* (2021) [18], a graviola apresenta um crescente efeito antibacteriano, tornando-a promissora, podendo ser utilizada como um nutracêutico ou com finalidades terapêuticas na indústria farmacêutica.

Dados da determinação da atividade antimicrobiana de *Annona muricata* (L.)

Tabela 1. Resultados antimicrobianos do extrato das folhas de *Annona muricata* (L.) e dos controles positivos.

Microrganismos	Concentrações EBS das folhas							
	50 mg/mL		25 mg/mL		12,5 mg/mL		6,25 mL/mL	
	C	EBS	C	EBS	C	EBS	C	EBS
Candida albicans	25	0	20	0	15	0	12	0
Streptococcus mutans	30	22	28	20	25	20	23	17
Staphylococcus aureus	23	0	20	0	18	0	13	0
Streptococcus agalactiae	17	0	15	0	12	0	10	0

EBS: Extrato Bruto Seco; C: Controle positivo; Resultados expressos em milímetros (mm).

Concentração letal média (CL_{50}) de *Annona muricata*

O uso de plantas medicinais provém de um conhecimento milenar, entretanto, Cansian *et al.* (2017) [20], ressaltam que os compostos bioativos são, na maioria dos casos, tóxicos em altas doses, desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido. Posto isso, segundo Lima (2019) [21] entre as diversas metodologias para avaliação da toxicidade de substâncias, uma que merece destaque é o bioensaio com *Artemia salina* Leach por apresentar elevada sensibilidade a agentes físicos e químicos.

Ao analisar a Figura 1, as folhas de *Annona muricata* (L.) obtiveram CL_{50} de 265, 66 μg/mL e natatória reduzida na concentração de 50 μg/mL. De acordo com o exposto

pela metodologia validada por Meyer *et al.* (1982) [10], este valor de concentração letal média indica que as folhas de graviola possuem potencial altamente tóxico. Tal toxicidade elevada pode ser justificada devido às folhas possuírem alcaloides, saponinas, terpenoides flavonoides, cumarinas, taninos, fenóis e acetogeninas [22]. Em maior evidência as acetogeninas, nas folhas da graviola a mais abundante é a anonacina, que é amplamente estudada devido suas atividades antiproliferativas contra múltiplas linhagens de células tumorais [7].

Avaliação da concentração letal média (CL_{50}) de *Annona muricata* (L.)

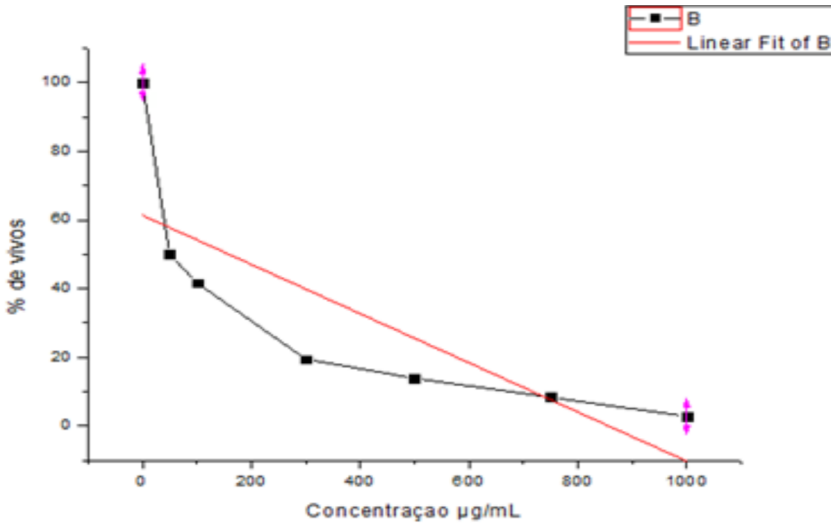


Figura 1. Gráfico do percentual de vivos em relação com a concentração do Extrato Bruto Seco das folhas de *Annona muricata* (L.)

Fragilidade osmótica eritrocitária de *Annona muricata* (L.)

O teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) validado por Dacie [11] vem sendo utilizado até os dias atuais como recurso preliminar para determinação toxicológica. Segundo Camargo *et al.* (2018) [23], os eritrócitos são extensamente utilizados em estudos de determinação de estrutura, composição e comportamento da membrana celular devido à sua estabilidade. Estes pesquisadores citam ainda que ao sofrer hemólise por ação de qualquer fator ambiental, as células vermelhas liberam hemoglobina no meio, as quais podem ser quantificadas por espectrofotometría a 540 nm (A_{540nm}).

No teste de fragilidade osmótica utilizando o extrato das folhas de *A. muricata*, obteve-se hemólise de 31,28% na concentração máxima de 1000 µg/mL. Esta parte vegetal pode ser caracterizada como potencialmente tóxica visto que a literatura aponta

que valores de hemólise a partir de 40% são definidos como tóxicos. Essa toxicidade pode estar relacionada com a presença de alcaloides, uma classe de metabólitos secundários que se caracterizam por apresentar uma ampla gama de atividades biológicas, no entanto, tornam as plantas altamente tóxicas [24]. Rocha (2017) [25] avaliou o potencial toxicológico de *Annona muricata* (L.) e determinou uma elevada atividade citotóxica *in vitro* diante das diferentes linhagens tumorais humanas, com maior efeito na linhagem NCI-H 460, na qual ocorreu redução da proliferação celular destas células após 48 horas de tratamento, enfatizando seu potencial tóxico antineoplásico.

Dados da determinação da fragilidade osmótica eritrocitária de *Annona muricata* (L.)

Tabela 2. Percentual de hemólise em relação com a concentração do Extrato Bruto Seco das folhas de *Annona muricata* (L.)

EBS das folhas de *Annona muricata* (L.)						
Controle	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**250 µg/mL**	**500 µg/mL**	**750 µg/mL**	**1000 µg/mL**
0,002	0,020	0,051	0,127	0,238	0,269	0,376
0,003	0,019	0,054	0,125	0,235	0,292	0,450
Média						
0,002	0,019	0,052	0,126	0,236	0,280	0,41
Percentual de hemólise						
0,15	1,43	3,93	9,54	17,8	21,21	31,28

Em razão das informações apresentadas neste trabalho, conclui-se que a espécie *Annona muricata* (L.) possui diversas aplicabilidades na medicina popular, na qual, suas folhas podem ser utilizadas desde que seu emprego seja efetuado com atenção já que as folhas da espécie apresentaram toxicidade relativamente elevada, devendo serem utilizados com cautela. Neste estudo, as folhas de graviola não apresentaram atividade antimicrobiana à frente das cepas de *Candida albicans, Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, obtendo resultados consideráveis de inibição contra *Streptococcus mutans*. Tal resultado pode ser associado às características do solvente extrativo utilizado, visto que pesquisadores divulgaram resultados promissores para extratos de *Annona muricata* (L.) com outros líquidos extrativos como metanol e água. Em vista desses fatos, destaca-se a potencialidade da graviola na produção de medicamentos, como alternativa terapêutica de baixo custo e efetiva segurança quanto a efeitos tóxicos.

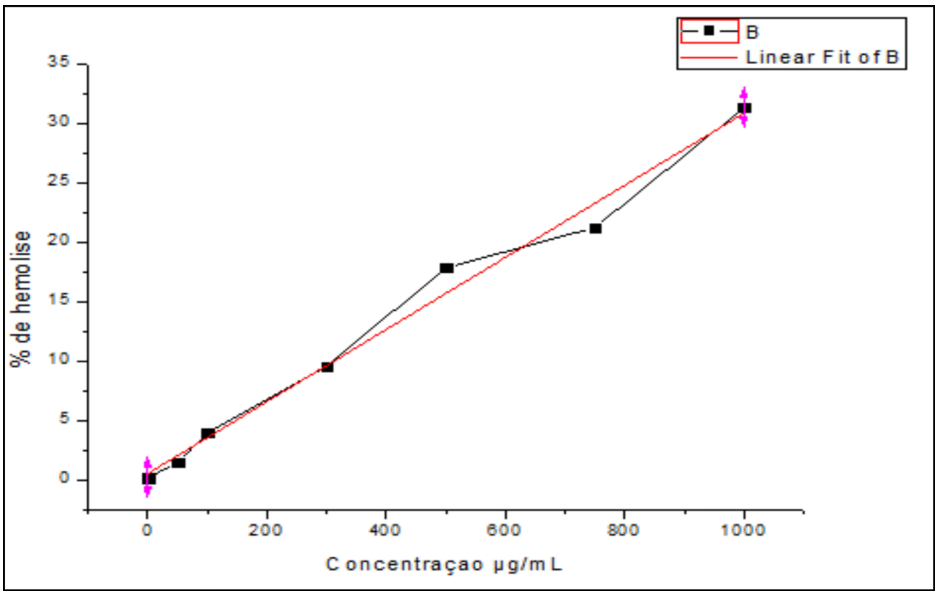


Figura 2. Gráfico do percentual de hemólise em relação com a concentração do Extrato Bruto Seco das folhas de *Annona muricata* (L.).

Conflitos de interesse

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

Referências

1. M.R. Badke, C.A. Somavilla, E.V. Heisler, A. Andrade, M.L.D. Budó, T.M.B. Garlet, Saber popular: Uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde, *Rev. Enferm. UFSM*, **6**(2), 225-234 (2016).

2. P.O. Viana, A.C.C.A. Ramos, Utilização de plantas medicinais como ferramenta de estímulo para o resgate de cultura e qualidade de vida, *Saber Científico*, **8**(1), 89-102 (2019).

3. N.C.S. Silva, A.M. Vítor, H.H.S. Bessa, R.M.S. Barros, A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde, *Única Cad. Acadêmicos*, **3**(1), Art 2, 1-5 (2017).

4. J.C.B. Braga, L.R. da Silva, Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19, *Braz. J. Health Rev.*, **4**(1), 3831-3839 (2021).

5. A.L.B. Zeni, A.V. Parisotto, G. Mattos, E.T.S. Helena, Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil, *Ciencia & Saude Coletiva*, **22**, 2703-2712 (2017).

6. A.K.R. Jardim, C.A. Parente, *Uso da graviola como coadjuvante no tratamento do câncer de próstata*, tese de graduação, Repositório Universitário da Ânima, 2021, pp. 1-45.

7. S. Sun, J. Liu, X. Sun, W. Zhu, F. Yang, L. Felczak, *et al.*, Novel Annonaceous acetogenins from Graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity, *Tetrahedron Lett.*, **58**(19), 1895-1899 (2017).

8. E.W. Koneman, S. Allen, *Diagnostico Microbiologico*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2008, vol. 6, p. 1691.

9. L.M.S. Silveira, R.S.G. Olea, J.S. Mesquita, A.L.N. Cruz, J.C. Mendes, Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: Comparação entre duas técnicas de ágar difusão, *Rev. Bras. Farmácia*, **90**(2), 24-28 (2009).

10. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E.J. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Med.*, **45**(5), 31-34 (1982).

11. J.V. Dacie, *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Elsevier Health Sciences, London, 2006, vol. 10, p. 650.

12. C.B.S. Brito, K.G. Correia, J.L. Beerra, J.C. Sousa, S.M. Andrade, M.A. Cunha, *et al.*, O uso de antibióticos e sua relação com as bactérias multirresistentes em hospitais, *Res. Soc. Dev.*, **9**(11), e2129119852 (2020).

13. P.J.L. Vieira, L.T. Freitas, Atuação do farmacêutico na dispensação de antimicrobianos com foco na resistência bacteriana, *Braz. J. Dev.* (Curitiva), **7**(5), 48234-48244 (2021).

14. A.L.V. Rios, *Acinetobacter baumannii: Por que novos antibióticos são necessários?*, tese de graduação, Universidade Federal de São Carlos, 2021, 49 p.

15. K.K.F.A. Cesar, A.K.R. Batista, L.R. Paula, R.T. da Silva, F.L. da Silva, Ação antifúngica de extratos e frações de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp, *Res. Soc. Dev.*, **10**(5), e28010514938 (2021).

16. B.H.M. Pai, G. Rajesh, R. Shenoy, A. Rao, Anti-microbial efficacy of soursop leaf extract (*Annona muricata)* on oral pathogens: An *in-vitro* study, *J. Clin. Diagnostic Res.*, **10**(11), 01-04 (2016).

17. G. Haro, N.P. Utami, E. Sitompul, Study of the antibacterial activities of soursop (*Annona muricata* L.) leaves, *Int. J. PharmTech Res.*, **6**(2), 575-581 (2014).

18. A.K.R. Batista, K.K.F.A. Cesar, L.R. Paula, F.L. da Silva, H.L.O. Raposo, Potencial antibacteriano (*in vitro*) do extrato metanólico da *Annona muricata* L, *Res. Soc. Dev.*, **10**(5), e33510514950 (2021).

19. L.I. Ardolino, M. Meloni, G. Brugali, E. Corsini, C.L. Galli, Preclinical evaluation of tolerability of a selective, bacteriostatic, locally active vaginal formulation, *Curr. Ther. Res.*, **83**, 13-21 (2016).

20. R.L. Cansian, A.B. Vanin, T. Orlando, S.P. Piazza, B.M.S. Puton, R.I. Cardoso, *et al.*, Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*, *Braz. J. Biol.*, **77**(1), 155-161 (2016).

21. L.M.V. Lima, *Avaliação toxicológica das apresentações de ácido acetilsalícilico e paracetamol frente á Artemia salina Leach*, tese de graduação, Universidade Federal de Campina Grande, 2019, 1-44 p.

22. A.K. Qazi, J.A. Siddiqui, R. Jahan, S. Chaudhary, L.A. Walker, Z. Sayed, *et al.*, Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers, *Carcinogenesis*, **39**(4), 522-533 (2018).

23. A.G. Moraes-Camargo, *Avaliação da toxicidade celular em humanos induzida por n-(fosfonometil) glicina e demais componentes da formulação de uso comercial*, trabalho de conclusão de curso, Universidade de São Paulo, 2018, 56 p.

24. D.P.S. Alfaia, Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona muricata* L.(Annonaceae), *Biota Amaz.*, **6**, 26-30 (2016).

25. G.G.G. Rocha, *Atividade citotóxica das frações, subfrações e annonacinona obtidos de sementes de Annona muricata L*, disartação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2017, pp. 1-91.

Como citar este artigo

j.R. Gomes da Silva, E.R. Diniz-Melo, A.J. Oliveira, J. Gonçalves-Silva, I. Alves da Silva, E.P. Nunes de Araujo, L.M. Bezerra da Silva, R. Pereira-Cordeiro, Determinação da atividade antimicrobiana e toxicológica das folhas de *Annona muricata* Linn (graviola), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 407-420 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.102426

Artigo de revisão / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.105316*

Potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória e antifúngica da *Anacardium occidentale* (Linn): Revisão de literatura

Antônio Rony da Silva Pereira Rodrigues

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903, Brasil.

Correio eletrônico: ronny346silva@gmail.com

Recebido: 24 de outubro de 2022

Revisado: 12 de fevereiro de 2023

Aceto: 19 de fevereiro de 2023

Resumo

Introdução: as flores, folhas, cascas, frutas e nozes *de A. occidentale* são ricas em compostos fenólicos e flavonoides, seu alto potencial anti-inflamatório e antioxidante oferece proteção às células. A pseudofruta e a casca de *A. occidentale* têm polifenóis, principalmente taninos, que agem como antibióticos naturais. **Objetivo**: o presente estudo teve como objetivo analisar o potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e antifúngico do *Anacardium occidentale* L. **Metodologia**: trata-se de uma revisão integrativa da literatura que pesquisa as bases de dados: ScienceDirect (Elsevier), Google Scholar (Google) e Redalyc (Scholarly Scientific Information System Redalyc), de julho a agosto de 2022. Os artigos passaram por um processo seletivo para a eliminação de duplicatas utilizando Mendeley Desktop e, em seguida, pelo *software* livre *Rayyan QCRI*, lidos na íntegra e os principais dados analisados e coletados após a Avaliação Crítica do *Evidencer do Hierarchy of Evidence for Intervention Studies*. Dez itens foram selecionados, seguindo o desenho temporal. **Resultados**: quatro artigos falavam sobre atividade antioxidante, sete sobre atividade antimicrobiana, um sobre atividade anti-inflamatória e antifúngica, alguns artigos relatam mais de um potencial terapêutico. **Conclusão**: estudos mostraram que *o Anacardium occidentale* tem potencial medicinal, principalmente no uso de folhas, casca e goma, e pode atuar como um inibidor de sítios inflamatórios, espécies bacterianas como *Escherichia coli* e

Staphylococcus aureus. Além de promover a ação antioxidante devido à presença de flavonoides, taninos, polifenóis e vitamina C.

Palavras-chave: Anacardium occidentale, potencial fitoterapêutico, bioprospecção.

Summary

Antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antifungal potential of *Anacardium occidentale* (Linn): Literature review

Introduction: the flowers, leaves, peels, fruits, and nuts of *A. occidentale* are rich in phenolic compounds and flavonoids, their high anti-inflammatory and antioxidant potential offers protection to cells. The pseudo fruit and bark of *A. occidentale* have polyphenols, mainly tannins, which act as natural antibiotics. **Objective**: to analyze the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antifungal potential of *Anacardium occidentale* L. **Methodology**: this is an integrative review of the literature that searches the databases: ScienceDirect (Elsevier), Google Scholar (Google) and Redalyc (Scholarly Scientific Information System Redalyc), from July to August 2022. The articles underwent a selection process for the elimination of duplicates using Mendeley Desktop and then by *the free software Rayyan QCRI*, read in full and the main data analyzed and collected after the Critical Assessment of evidence hierarchy of evidence for intervention studies. Ten items were selected, following the temporal design. **Results**: four articles talked about antioxidant activity, seven about antimicrobial activity, one on anti-inflammatory and antifungal activity, some articles report more than one therapeutic potential. **Conclusion**: studies have shown that *Anacardium occidentale* has medicinal potential, mainly in the use of leaves, bark and gums, and can act as an inhibitor of inflammatory sites, bacterial species such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus.* In addition to promoting antioxidant action due to the presence of flavonoids, tannins, polyphenols, and vitamin C.

Key words: Anacardium occidentale, phytotherapeutic potential, bioprospection.

Resumen

Potencial antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y antifúngico de *Anacardium occidentale* (Linn): Revisión de la literatura

Introducción: las flores, hojas, cáscaras, frutos y frutos secos *de A. occidentale* son ricos en compuestos fenólicos y flavonoides, su alto potencial antiinflamatorio y antioxidante ofrece protección a las células. La pseudofruta y la corteza de *A. occidentale* tienen polifenoles, principalmente taninos, que actúan como antibióticos naturales. **Objetivo**: analizar el potencial antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y antifúngico de *Anacardium occidentale* L. **Metodología**: se trata de una revisión integradora de la literatura que busca en las bases de datos: ScienceDirect (Elsevier), Google Scholar (Google) y Redalyc (Scholarly Scientific Information System Redalyc), de julio a agosto de 2022. Los artículos se sometieron a un proceso de selección para la eliminación de duplicados utilizando Mendeley Desktop y luego por *el software* libre *Rayyan QCRI*, leídos en su totalidad y los principales datos analizados y recopilados después de la Evaluación Crítica de la jerarquía de evidencia para estudios de intervención. Se seleccionaron diez ítems, siguiendo el diseño temporal. **Resultados**: cuatro artículos hablaron sobre la actividad antioxidante, siete sobre la actividad antimicrobiana, uno sobre la actividad antiinflamatoria y antifúngica, algunos artículos reportan más de un potencial terapéutico. **Conclusión**: los estudios han demostrado que el *Anacardium occidentale* tiene potencial medicinal, principalmente en el uso de hojas, corteza y encías, y puede actuar como inhibidor de sitios inflamatorios, especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus.* Además de promover la acción antioxidante debido a la presencia de flavonoides, taninos, polifenoles y vitamina C.

Palabras clave: Anacardium occidentale, potencial fitoterapéutico, bioprospección.

Introdução

Os microrganismos patogênicos estão se tornando cada vez mais resistentes aos fármacos atualmente utilizados, o que pode acarretar implicações diretas a segurança dos pacientes. A presença de pacientes de longa estadia em unidades hospitalares, acarreta o uso de antibióticos de longo espectro, principalmente por não existir uma terapia alternativa. Estima-se que até 2050 as infecções bacterianas se tornem responsáveis

pelo óbito de 10 milhões de pessoas por ano, se tornando uma epidemia com graves consequências [1, 2].

Devido à resistência de bactérias e fungos, cada vez mais as pesquisas se voltaram a buscar novos meios tecnológicos de obtenção de substâncias com capacidades terapêuticas, com destaque para o uso de plantas medicinais como fonte de matéria prima. A maior parte da produção de plantas medicinais é oriunda de processos extrativistas, mas também é comum o plantio e uso domiciliar, mesmo sem estudos científicos que asseguram o uso [3].

Atualmente cerca de 30% dos fármacos obtidos no mundo possuem alguma substância extraída diretamente ou indiretamente de uma espécie vegetal. De 1981 a 2002, 50% das drogas desenvolvidas foram obtidas de produtos naturais [4].

Entre as espécies com destaque em estudos científicos no Brasil e no mundo, está a *Anacardium occidentale*. *Anacardium occidentale* L. é uma planta tropical que ocorre principalmente no nordeste do Brasil. Estudos fitoquímicos demostraram a presença de compostos biológicos, como flavonóides, carotenóides e vitaminas (C e A) presente no fruto. Esses compostos fitoquímicos estão relacionados a atividades biológicas importantes, devido a isso a *Anacardium occidentale* tem isso utilizada em medicamentos alternativos na atenção primária à saúde [5-7].

Pesquisas descrevem que o uso de flores, caule, raízes, cascas, castanhas e goma de cajueiro podem estar relacionadas a múltiplas aplicações terapêuticas, como atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antidiarreica, gastroprotetora, anticarcinogênica, antimicrobiana e antifúngica. A goma do cajueiro já de demostrou eficiente contra bactérias gram-positivas, além de não possuir baixo efeito citotóxico. Essa aplicação farmacológica também sugeriu atividade anti-inflamatória, como alternativa ao tratamento de lesões de pele e gastrointestinais [8].

As flores, folhas, cascas, frutos e nozes de *A. occidentale* são ricos em compostos fenólicos e flavonóides, seu alto potencial anti-inflamatório e antioxidante oferece proteção as células. O pseudofruto e as cascas de *A. occidentale* possuem polifenóis, principalmente taninos, que agem como antibióticos naturais, o que atribui ao cajueiro atividade antimicrobiana [9, 10].

Tendo em vista a necessidade de novas reflexões acerca do uso de produtos naturais na obtenção de fármacos e como *Anacardium occidentale* L., pode ser uma planta em destaque por possuir substâncias químicas que pode atuar em diferentes terapias alternativas, o presente estudo objetivou pesquisar na literatura quais compostos da

A. occidentale podem atuar como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antifúngicos, em qual parte da planta pode ser encontrado e seus métodos de ação.

Metodologia

O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa (RI). A revisão integrativa de literatura permite reunir e sintetizar resultados sobre determinada temática, afim de contribuir para o aprofundamento sobre o tema investigado. Esse método exige a formulação de uma problemática, a pesquisa na literatura, a avaliação do conjunto de achados, a análise dos dados e a apresentação dos resultados obtidos [11, 12].

Tendo em vista o objetivo do estudo, na primeira fase, foi proposto o seguinte questionamento: quais compostos podem estar relacionados a ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana da *Anacardium occidentale*?

Seguidamente, foi realizada entre os meses de julho e agosto de 2022, a busca dos estudos nas bases de dados. A busca se deu nas bases ScienceDirect (*Elsevier*), Google acadêmico (*Google scholar*) e Redalyc (*Sistema de Información Científica Redalyc*). A pesquisa por artigos foi feita com o uso dos termos em língua portuguesa e inglesa: "*Antifungal action*" and "*Anacardium occidentale*", "*Anti-inflammatory action*", "*Antimicrobial action*", "*Antioxidant action*", junto ao operador boleano *AND*.

Para selecionar os artigos foram aplicados critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: a) Artigos publicados entre 2018 a 2022, em qualquer idioma; b) artigos disponíveis na íntegra; c) trabalhos dentro da temática do estudo; d) estudos que respondessem à pergunta norteadora. Os critérios de exclusão foram: a) artigos incompletos ou que estivesse disponível na íntegra; b) resumos de trabalhos publicados em eventos; c) livros, capítulos e resenhas de livros; d) trabalhos fora do período de delineamento temporal; e) teses e dissertações; f) trabalhos fora da temática do estudo. Os artigos obtidos foram recuperados e as duplicatas retiradas com uso do Mendeley Desktop.

A busca, foi realizada por dois pesquisadores independentes, anteriormente treinados para avaliar títulos, resumos e aplicação dos testes de relevância (critérios de inclusão e exclusão), com uso do *software* gratuito *Rayyan QCRI* [13]. Os artigos selecionados foram lidos na íntegra e os dados de interesse para o estudo foram dispostos em planilha no *Microsoft Excel* em conformidade com o *Critical Appraisal of the Evidence* [14].

Com objetivo de analisar as evidências foi feito uso do *Hierarchy of Evidence for Intervention Studies:* Nível I–Revisão sistemática de meta-análises; Nível II–Ensaios controlados randomizados; Nível III–Ensaios controlados sem randomização; Nível

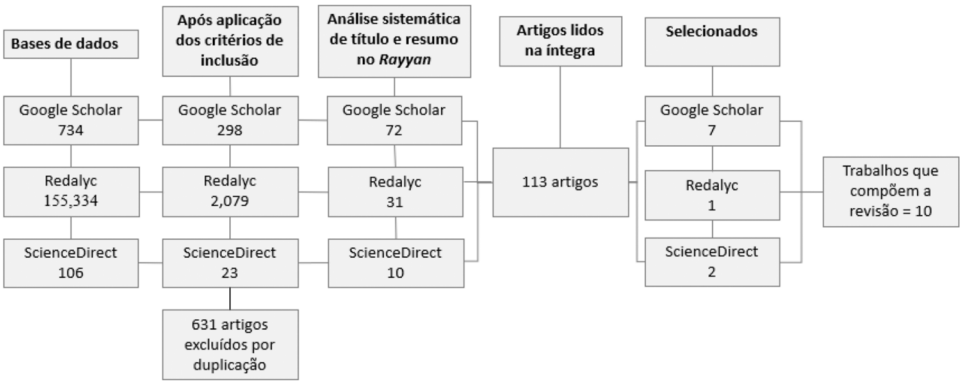


Figura 1. Fluxograma do processo de seleção das publicações para o estudo.

Fonte: os autores, 2022.

IV– Caso controle ou Estudo de coorte; Nível V–Revisão sistemática de estudos qualitativos ou descritivos; Nível VI–estudo qualitativo ou descritivo; Nível VII–opinião ou consenso de especialistas [15].

Resultados e discussão

com o levantamento bibliográfico nas bases de dados foram recuperados 156.174 artigos. Com a aplicação de critérios de exclusão e leitura de título e do resumo no *Rayyan*, 631 artigos foram excluídos por duplicação, 2.400 estudos tiveram título e resumo lidos sistematicamente, onde 113 artigos foram lidos para serem lidos na íntegra, 103 trabalhos foram excluídos por não responder ao objetivo do estudo. Ao final, foram selecionados 10 artigos para compor a amostra final (figura 1).

Enquanto ao período de publicação, ocorreu entre 2018 a 2022, predominando no ano de 2021 com 04 artigos [16-19], seguido pelo ano de 2020 com 02 artigos [20, 21], 2019 com 02 artigos [22, 23], 2018 com 02 artigos [24, 25], por último o ano de 2022 apresentou 01 artigo [26].

Ao que se relaciona aos níveis de hierarquias das evidências [15], os 10 artigos que compõem o estudo são caracterizados como Nível II, são estudos clínicos randomizado controlado de caráter laboratorial. Que demostra que pesquisas e avanços importantes estão sendo realizadas sobre o uso da *A. occidentale* para fins terapêuticos. A síntese dos artigos analisados nesta revisão integrativa está descrita no quadro 1.

Quadro 1. Síntese das bases de dados, análise dos artigos, hierarquia das evidências e autores dos artigos analisados neste estudo.

Base de dados	Análise dos artigos	Hierarquia das evidências	Referência
ScienceDirect	A adição de 20% de extrato foliar ao filme de carboximetilquitosana aumentou a atividade antioxidante em 6 vezes. O extrato foliar *de A. occidentale* promoveu taxa de inibição média de 72 e 81% contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus,* respectivamente.	II	[26]
Google Scholar	Os extratos de casca e folha de *A. occidentale* L. demostraram potencial antimicrobiano, com c com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 312,5 a 10.000 µg/mL. As espécies bacterianas *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*, foram as mais suscetíveis	II	[16]
ScienceDirect	Foi observado um efeito antifúngico do extrato das cascas contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, com IC_{50} inferior a 400 µg / mL.	II	[17]
Google Scholar	Com o método de atividade de degradação radical (DPPH), foi possível medir a atividade antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidratada e quantificar na amostra de pó de folhas, quantidades significantes de vitamina C (7,72 mg/g). A capacidade antioxidante relatada foi de 42,24%, que sugere a atividade antioxidante.	II	[18]
Google Scholar	Os extratos foliares e de cascas, promoveu a inibição do crescimento bacteriano Gram positivo com concentração inibitória mínima de 62,5 – $250^{[-50]}$ µg/mL em *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis, S. saprophyticus*; e CIM de 500 – 2000 µg/mL em *Streptococcus mutans*.	II	[19]
Google Scholar	A atividade inibitória da fração de extrato foliar em acetato de etila contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* variaram de 15,0 mm a 19,0 mm de diâmetro da zona inibidora a 100 mg/mL.	II	[20]

(*Continua*)

Base de dados	Análise dos artigos	Hierarquia das evidências	Referência
Google Scholar	A utilização de extrato foliar promove redução no infiltrado inflamatório, volume nuclear, congestão sinusóide e colestase, além do aumento das enzimas superóxido dismutase e catalase.	II	[21]
Redalyc	O estudo, demostra que os diâmetros da zona de inibição estão na faixa de 10 a 15 mm, que pode ser considerado como uma ação antimicrobiana média. Sendo a *Staphylococcus aureus* o microrganismo mais sensível ao extrato foliar.	II	[22]
Google Scholar	Foi observado que o percentual do efeito de eliminação de radicais livres aumentou com o aumento da concentração de 20 a 100 µg/ml, com uso de extratos foliares e de cascas. A porcentagem de inibição de radicais livres varia de 26,33±1,96% a 20 µg/ml a 34,72±1,53% a 100 µg/mL	II	[23]
Google Scholar	Com o uso do extrato foliar de *A. occidentale* percebeu-se sensibilidade da espécie *Salmonella typhimurium ao extrato.* A triagem fitoquímica indicou a presença de conteúdo fenólico total (405,54±27,50 mg/g) e flavonoides totais (2,378±0,38 mg/g) no extrato que confirma suas atividades inibitórias.	II	[24]
Google Scholar	Extratos aquoso e etanoico de cascas da castanha de caju demostraram ação inibidora frente *Streptococcus aureus* e *Bacillus cereus* concentração inibitória mínima de 3,13, para ambas as espécies, com uso de 100 µg/mL dos extratos.	II	[25]

Fonte: os autores, 2022.

Com relação a atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Anacardium occidentale* L., foi visualizado em quatro artigos [18, 21, 23, 26]. Sete artigos selecionados para compor a revisão integrativa relatam sobre a atividade antimicrobiana [16, 19, 20, 22, 24-26], um artigo descreve sobre a atividade antifúngica [17] e apenas um artigo fala sobre atividade anti-inflamatória [21].

Com relação a atividade antioxidante os estudos selecionados descrevem que entre as partes da *Anacardium occidentale* L., as folhas e cascas possuem o maior indicador antioxidante. A atividade de degradação radical (DPPH) demostrou que o uso de extratos foliares e de cascas de cajueiro, apresentaram porcentagem de inibição de radicais livres varia de 26,33±1,96% a 20 µg/mL a 34,72±1,53% a 100 µg/mL [23].

Com o método de avaliação da atividade de degradação antioxidante radical (DPPH), é possível medir a atividade antioxidante do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidratada, presente no pó de folhas de *Anacardium occidentale* L., além de quantificar 7,72 mg/g de vitamina C, o que representa quantidade significante, que pode indicar a atividade antioxidante. A associação de extratos foliares ao filme de carboximetilquitosana e aumentou a atividade antioxidante em 6 vezes [18, 26].

Outras espécies da família Anacardiaceae, como a *Anacardium humile* A. St.-Hil., demostra que o gênero *Anacardium* possui diferentes espécies com potencial antioxidante. Estudos utilizando extratos etanoicos foliares de *A. humile* em ensaios de α-amilase, apresentaram notável capacidade de inibição de radicais livre, com valores de concentração inibitória (IC_{50}) de 0,56±0,10 e 0,84±0,01, para os métodos de fração de diclorometano (DCM) e fração de acetato de etila (EtOAc), respectivamente. Moléculas de kaempferol, quercetina, catequina, ácido gálico e luteolin foram encontradas, sendo diretamente relacionadas as atividades antioxidantes [27].

Os estudos com uso de *Anacardium occidentale* como potencial inibidor microbiano usam como espécie para teste espécies dos gêneros *Streptococcus, Escherichia* e *Staphylococcus*. Avaliando o potencial antimicrobiano de extratos de cascas e folhas de *A. occidentale* L., frente as espécies bacterianas *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*. Os extratos demostraram concentração inibitória mínima (CIM) variando de 312,5 a 10.000 μg/mL [16]. Utilizando extrato foliar metanoico de *A. occidentale* L., frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* demostrou sensibilidade das espécies aos extratos, sendo a *E. coli* mais sensível, apresentando concentração inibitória mínima (MIC) em 0,353 mg/mL [28].

O extrato foliar de *A. occidentale* L. atua como redutor no infiltrado inflamatório, volume nuclear, congestão sinusóide e colestase, além de promover aumento das enzimas superóxido dismutase e catalase [21].

Testes laboratoriais avaliando os efeitos da administração de castanha de caju na dose 100 mg/kg em ratos antes da administração de injeção de carragenina (CAR), conclui que a administração 30 minutos antes foi capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a liberação de IL-10. A avaliação histológica em edemas na pata induzidos por carragenina, tendo sido administrado castanha de caju mostrou redução na lesão histológica e neutralização da infiltração celular e a formação de edema [29].

Foi identificado nas cascas de *Anacardium occidentale* quatro compostos que podem esta ligados a atividade antifúngica, sendo elas: ácido gálico, luteolin, galato de epicatequina e agathisflavone. O extrato de casca de cajueiro promoveu inibição frente as

cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, com IC_{50} de 400 μg/mL, além de ação sinérgica com fluconazol contra *C. albicans* e *C. tropicalis* [17].

O uso de goma de cajueiro para formulação de comprimidos vaginais bioadesivos favorece a biodisponibilidade quando associado a formulação de clotrimazol, aumentando a solubilidade do fármaco e aumentando a ação antifúngica [30].

Conclusões

De uma forma geral, a parte mais utilizada nas pesquisas para avaliar potenciais terapêuticos, são as folhas e cascas de *Anacardium occidentale* L., essas partes são comumente pesquisadas devido a facilidade de obtenção de seus extratos e por já ter estudos na literatura que estruturam cientificamente a presença de compostos fitoquímicos como flavonoides e polifenóis.

Os extratos de cascas e folhas e o uso goma demostram uma alternativa tecnológica para bioprospecção de fármacos com alto potencial anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico e antimicrobiano. A associação de extratos de cajueiro a fármacos já utilizados na medicina também se mostra uma alternativa viável, afim de explorar a ação sinérgica e as atividades terapêuticas.

A *Anacardium occidentale* se demostra uma valiosa espécie com fins terapêuticos, principalmente na obtenção de fármacos antimicrobianos, visto que seus extratos apresentam concentração inibitórias mínimas e máximas significante frente aos gêneros *Streptococcus, Escherichia* e *Staphylococcus*, que são gêneros com bactérias patogênicas que causam doenças em seres humanos.

Com essa pesquisa demostramos a necessidade de novas pesquisas sobre a importância da *A. occidentale* como espécie para ser explorada com fins farmacêuticos, principalmente no que tange a formulação de medicações antimicrobianas. Novos estudos necessitam ser realizados para avaliar o potencial antifúngico dos extratos de cajueiro, pois é a temática menos trabalhada. Outras pesquisas devem surgir afim de assegurar cientificamente o uso da *Anacardium occidentale* com fins medicinais.

Sendo assim, o presente estudo contribuiu com novas reflexões acerca do uso da *Anacardium occidentale* como alternativa terapêutica e medicinal, com destaque quando se fala nas ações anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobiana.

Conflitos de interesse

os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

1. a.V. Viana, D.D.S.F. Viana, G.S. de Figueirêdo, J.E. de Brito, V.G.F. Viana, V.G. F.V. Junior, Potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizadas em curcumina e extrato de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), *Research, Society and Development*, **10**(9), e47610918364 (2021).

2. M.S.D. Mello, A.C. Oliveira, Overview of the actions to combat bacterial resistance in large hospitals, *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, **29**, e3407 (2021).

3. A.K.C. da Conceição, Á.G. dos Santos-Lira, O.J.M. Moreira, L.M.R. de Sousa, H.J.M. Pereira, V.H.R. de Abreu, T.A. Vieira, Plantas medicinais: um saber tradicional como alternativa no processo de cura, *Revista Agroecossistemas*, **10**(2), 238-254 (2018).

4. M.J.F. Macêdo, D.A. Ribeiro, M.D.O. Santos, D.G.D. Macêdo, J.G.F. Macedo, B.V.D. Almeida, M.M.D.A. Souza, Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **28**, 738-750 (2018).

5. V.D.C.N. Bitu, V.D.C.N. Bitu, E.F.F. Matias, W.P. de Lima, A. da Costa-Portelo, H.D.M. Coutinho, I.R.A. de Menezes, Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil, *Journal of Ethnopharmacology*, **172**, 265-272 (2015).

6. I. Kubo, T. Nitoda, F.E. Tocoli, I.R. Green, Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*, *Phytotherapy Research*, **25**(1), 38-45 (2011).

7. M. Kulis, I. MacQueen, Y. Li, R. Guo, X.P. Zhong, A.W. Burks, Pepsinized cashew proteins are hypoallergenic and immunogenic and provide effective immunotherapy in mice with cashew allergy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **130**(3), 716-723 (2012).

8. N.S. Carvalho, M.M. Silva, R.O. Silva, L.A. Nicolau, F.B.M. Sousa, S.R. Damasceno, J.V.R. Medeiros, Gastroprotective properties of cashew gum, a complex

heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen- induced gastrointestinal damage in rats, *Drug Development Research*, 76(3), 143-151 (2015).

9. B. Salehi, M. Gültekin-Özgüven, C. Kırkın, B. Özçelik, M. Morais-Braga, J.P.N. Carneiro, C.W.C. Cho, *Anacardium* plants: Chemical, nutritional composition and biotechnological applications, *Biomolecules*, **9**, 465 (2019).

10. A.V. Pereira, T. Kelly, B. De Azevêdo, Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana, *Agropecuária Técnica*, **36**(1), 121-127 (2015).

11. C.M. Galvão, N.O. Sawada, M.A. Trevizan, Revisão sistemática: recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem, *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, **12**, 549-556 (2004).

12. R. Whittemore, K. Knafl, The integrative review: Updated methodology, *Journal of Advanced Nursing*, **52**(5), 546-553 (2005).

13. M. Ouzzani, H. Hammady, Z. Fedorowicz, A. Elmagarmid, Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews, *Systematic Reviews*, **5**(1), 210 (2016).

14. S.B. Stillwell, E. Fineout-Overholt, B.M. Melnyk, K.M. Williamson, Evidence--based practice, step by step: Asking the clinical question: a key step in evidence--based practice, *The American Journal of Nursing*, **110**(3), 58-61 (2010).

15. B.M. Melnyk, E. Fineout-Overholt, S.B. Stillwell, K.M. Williamson, Evidence-based practice: step by step: The seven steps of evidence-based practice, *The American Journal of Nursing*, **110**(1), 51-53 (2010).

16. L.S. Amorim, P.E. Marques-Goes, R.D.A. Figueiredo, J.A.D.C.R. Souza, J.F. Tavares, L.R.C. Castellano, S.G. de Aquino, *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of *Anacardium occidentale* L. extracts and their toxicity on PBMCs and zebrafish embryos, *Drug and Chemical Toxicology*, **45**(6), 2653-2663 (2021).

17. A.R. Costa, J.W. Almeida-Bezerra, T.G. da Silva, P.S. Pereira, E.F.O. Borba, A.L. Braga, L.M. Barros, Phytochemical profile and anti-Candida and cytotoxic potential of *Anacardium occidentale* L.(cashew tree), *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **37**, 102192 (2021).

18. O.D. Oloruntola, Proximate, phytochemical, mineral composition and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. leaf powder, *DYSONA-Life Science*, **2**(4), 39-49 (2021).

19. N.C. Ribeiro, F.E.M.D. Lima-Neto, A.R.D.A. Nobre, D.A.D. Silva, S.J. Mayo, I.M.D. Andrade, Potential antioxidant and antibacterial bioactivity of leaf and stem bark extracts in wild cashew (*Anacardium occidentale* L.) populations from coastal Piauí, Northeastern Brazil, *Feddes Repertorium*, **132**(2), 141-157 (2021).

20. S.B. Aponjolosun, R.T. Fasola, Phytochemical, antimicrobial and toxicity evaluation of *Anacardium occidentale* Linn. leaf extracts. *Tropical Journal of Natural Product Research*, **4**(4), 113-122 (2020).

21. A.B. Baptista, M.M. Sarandy, R.V. Gonçalves, R.D. Novaes, C. Gonçalves da Costa, J.P.V. Leite, M.D.C.G. Peluzio, Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Anacardium occidentale* L. and *Anacardium microcarpum* D. extracts on the liver of IL-10 knockout mice, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, 3054521 (2020).

22. S. Koteich-Khatib, J. Vivas, A. Bahsas, Y. Rosales-Oballos, J. Bullón, Caracterización por RMN y actividad antibacteriana de los componentes del aceite de la semilla de merey (*Anacardium occidentale* L.), *Avances en Química*, **14**(1), 31-40 (2019).

23. S.L. Sija, A.V. Anand, A. Sasankan, A. Anil, *In Vitro* antioxidant activity and antibacterial activity of ethyl acetate extract of medicinal tree species, *Anacardium occidentale* L. and *Mangifera indica* L, *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, **12**(2), 115-120 (2019).

24. B. Laxmanaswami, A. Urooj, Phytochemical profile and antimicrobial activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract, *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, **5**(3), 095-098 (2018).

25. Y. Sudjaroen, Antioxidant, antibacterial, and cytotoxicity activities of cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell waste, *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, **12**(01), S229-S234 (2018).

26. P.P. Nadira, V.A. Mujeeb, P.M. Rahman, K. Muraleedharan, Effects of cashew leaf extract on physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of N, O–Carboxymethyl chitosan films, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, **3**, 100191 (2022).

27. J.P. de Lima Júnior, R.R. Franco, A.L. Saraiva, I.B. Moraes, F.S. Espindola, *Anacardium humile* St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α-amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, **268**, 113667 (2021).

28. N.A.N.M.A. Jinah, H.A. Yusof, H.M. Jusoh, Antimicrobial properties of *Anacardium occidentale* (Cashew) leaf extract against staphylococcus aureus and *Escherichia coli*, *International Journal of Allied Health Sciences*, **4**(3), 1496-1506 (2020).

29. M. Cordaro, R. Siracusa, R. Fusco, R. D'Amico, A.F. Peritore, E Gugliandolo, D. Impellizzeri, Cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts counteract oxidative stress and inflammation in an acute experimental model of carrageenan-induced Paw edema, *Antioxidants*, **9**(8), 660 (2020).

30. U. Hani, G. Krishna, H.G. Shivakumar, Design and optimization of clotrimazole–hydroxypropyl-β-cyclodextrin bioadhesive vaginal tablets using Anacardium occidentale gum by 3^2 factorial design, *RSC Advances*, **5**(45), 35391-35404 (2015).

Como citar este artigo

A.R.d.S. Pereira-Rodrigues, Potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória e antifúngica da *Anacardium occidentale* (Linn): Revisão de literatura, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 421-434 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.105316

Artigo de revisão / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109392*

Potencial farmacológico da canela-de-velho (*Miconia albicans*): Uma revisão integrativa

Thays Milena Silva Lopes[1a], Gustavo Fernandes Queiroga Moraes[2b]*, Ana Laura de Cabral Sobreira[3c], Julia Beatriz Pereira de Souza[1d]

[1]Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brasil.

[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

[3]Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Correios eletrônicos:

[a]tmilena012@gmail.com, [b]gustavo.queiroga@usp.br, [c]lauracabralas@gmail.com,

[d]julia.beatriz@professor.ufcg.edu.br

Recebido: 16 de janeiro de 2023

Revisado: 16 de fevereiro de 2023

Aceto: 19 de fevereiro de 2023

Resumo

Objetivos: o presente estudo teve como finalidade realizar uma revisão da literatura sobre a planta *Miconia albicans* e seu potencial terapêutico. **Metodologia:** trata-se de uma revisão do tipo integrativa sem limitação de tempo nas bases de dados científicos PubMed, ScienceDirect, Google Acadêmico e na BVS. **Resultados:** dos 113 artigos recuperados nas bases de dados, 31 foram selecionados para compor os resultados, em que foram identificados os compostos fenólicos e os terpenos como as classes de metabólitos secundários, mais prevalentes. Se evidenciou condições relacionadas a dores articulares como artrite, artrose e dor na coluna/costas, como os problemas mais relacionados ao seu uso. As atividades anti-inflamatória e antimicrobiana foram as mais frequentes entre os estudos, mas também foram obtidos resultados positivos para as atividades antioxidante, ansiolítica, anticonvulsivante, analgésica, antidiabética e propriedades antiofídicas. Foram atribuídos também possíveis mecanismos de ação, o antioxidante ligado ao sequestro de radicais livres, anti-inflamatório a inibição de enzimas da cascata do ácido araquidônico, bloqueio do aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, diminuição dos níveis de adipocitocinas e dos receptores solúveis do TNF-α, antidiabético inibição da proteína tirosina fosfatase

1B e ansiolítico relação com os receptores gabaérgicos. **Conclusão:** à vista disso, a literatura aponta para a necessidade de mais estudos, para uma confirmação confiável, em que se possa garantir um uso seguro da planta e a abertura de um leque de novas opções de terapias medicamentosas para a população.

Palavras-chave: Plantas medicinais, fitoterapia, etnofarmacologia, *Miconia albicans*.

Summary

Pharmacological potential of Canela-de-velho (*Miconia albicans*): A integrative review

Aim: Carry out a review of the literature on the plant *Miconia albicans* and its therapeutic potential. **Methodology:** this is an integrative review without time limitation in the scientific databases PubMed, ScienceDirect, Google Scholar and BVS. Results: From the results 113 articles in the databases, 31 were selected for the results, in which the results were designated phenolic compounds and terpenes as the most prevalent classes of metabolites. There is evidence of conditions related to joint pain such as arthritis, osteoarthritis and spine/back pain, as the problems most related to its use. As anti-inflammatory and antimicrobial activities were the most common among the studies, but they also obtained positive results as antioxidant, anxiolytic, anticonvulsant, analgesic, antidiabetic and antidepressant properties. Mechanisms of action were found, the bound antioxidant, which was attributed to free radicals, increased anti-intensity also of enzymes of the inflammatory acid cascade, blocking of two inflammatory cytokines, increased levels of adipo and NF -α soluble receptors, antidiabetic with respect to protein tyrosine phosphatase 1B and anxiolytic with GABAergic receptors. **Conclusion:** in view of this, the literature points to the need for more studies, for safe drug safety, in which one can guarantee the use of a range of new therapy options such as those of the population.

Keywords: Medicinal plants, phytotherapy, ethnopharmacology, *Miconia albicans*.

Resumen

Potencial farmacológico de la Canela-de-velho (*Miconia albicans*): Una revisión integradora

Objetivos: el presente estudio tuvo como objetivo realizar una revisión de la literatura sobre la planta *Miconia albicans* y su potencial terapéutico. **Metodología:** se trata de una revisión integradora sin límite de tiempo en las bases de datos científicas PubMed, ScienceDirect, Google Académico y la BVS. **Resultados:** de los 113 artículos recuperados de las bases de datos, se seleccionaron 31 para componer los resultados, en los que se identificaron los compuestos fenólicos y los terpenos como las clases más prevalentes de metabolitos secundarios. Se evidenciaron condiciones relacionadas con el dolor articular como artritis, osteoartritis y dolor en la columna/espalda, como los problemas más relacionados con su uso. Las actividades antiinflamatoria y antimicrobiana fueron las más frecuentes entre los estudios, pero también se obtuvieron resultados positivos para las propiedades antioxidantes, ansiolíticas, anticonvulsivas, analgésicas, antidiabéticas y antiofídicas. También se atribuyeron posibles mecanismos de acción, al antioxidante ligado a la captación de radicales libres, inhibición antiinflamatoria de las enzimas de la cascada del ácido araquidónico, bloqueo del aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias, disminución de los niveles de adipocitoquinas y receptores solubles del TNF-α, inhibición antidiabética de proteína tirosina fosfatasa 1B y relación ansiolítica con receptores GABAérgicos. **Conclusión:** ante esto, la literatura apunta para la necesidad de más estudios, para una confirmación fehaciente, en los que se pueda garantizar un uso seguro de la planta y la apertura de un abanico de nuevas opciones farmacoterapéuticas para la población.

Palabras clave: Plantas medicinales, fitoterapia, etnofarmacología, *Miconia albicans*.

Introdução

Com um uso que já vem sendo feito há muitos anos, as plantas medicinais continuam sendo fonte para a descoberta de novas substâncias ativas, e para a criação de novas moléculas de interesse farmacêutico. Isso se deve a etnofarmacologia, a qual, possibilita estudos para comprovação de atividades terapêuticas, a partir do uso tradicional e do conhecimento popular, para o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos [1-3].

Com distintos biomas, o Brasil é considerado o país com uma das maiores biodiversidades do planeta. No cerrado são comumente encontradas as plantas do gênero

Miconia, pertencentes à família Melastomataceae, caracterizadas por arbustos, ervas e árvores. A literatura indica que foram encontrados na família a presença de metabólitos secundários como glicosídeos cianogênicos, taninos hidrolisáveis e flavonoides, em menor quantidade alquilbenzenos e terpenos, bem como, flavonoides do tipo flavona e flavonóis glicosilados e a antocianina, isolados de frutos, flores e folhas, apresentam atividade antibacteriana e antioxidante. Além disso as atividades antimicrobiana, antitumoral, analgésica e antimaláricas são relatadas em extratos do gênero [4, 5].

Uma das espécies mais importantes da família Melastomataceae, a *Miconia albicans* é popularmente conhecida como "maria-branca", "lacre-branco", "folha-branca" e "canela-de-velho". Segundo relatos da literatura, sua indicação de uso popular é para o tratamento de reumatismo, artrose, artrite, vitiligo, infecções geniturinárias, regulação do ritmo cardíaco, antiofídico, prevenção de infartos, alívio de sintomas febris, e para problemas gástricos [6, 7]

Os riscos relacionados as plantas medicinais se devem a falta de informações e uso indevido. Assim, a comprovação técnico-científica sobre o potencial terapêutico e toxicológico é requisito indispensável para desenvolver o uso racional das plantas medicinais [8]. Neste contexto, o presente estudo se propõe a investigar o potencial terapêutico e toxicológica de *M. albicans*, através de uma revisão integrativa da literatura.

Metodologia

O presente estudo trata-se de uma pesquisa de revisão da literatura com o objetivo de responder às seguintes questões norteadoras:

- *Miconia albicans* apresenta potencial terapêutico?
- Se sim, quais constituintes fitoquímicos estariam relacionados aos efeitos?
- Quais os possíveis efeitos farmacológicos e mecanismos de ação envolvidos?

Delineamento do estudo

O estudo foi abordado por meio de um modelo de revisão integrativa de literatura, neste tipo de revisão primeiramente se delimita um tema, se faz um questionamento para a pesquisa, depois são estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão dos estudos, ou das pesquisas na literatura, em seguida são selecionadas as informações a serem extraídas dos estudos escolhidos, estes serão avaliados e interpretados, finalizando com a exposição da revisão e a síntese do conhecimento. Por fornecer informações mais abrangentes sobre um determinado assunto ou problema, é designada como integrativa, dessa forma pode ser elaborada com os mais diversos objetivos

como na revisão de teorias, definição de conceitos, e análises metodológicas dos estudos incluídos de um tópico particular. Enfim, possui a finalidade de resumir a obtenção de resultados em pesquisas sobre um tema/questão, de uma forma abrangente, sistemática e ordenada [9].

Estratégia de busca

A busca de material ocorreu entre os meses de julho a dezembro de 2021 de forma sistemática, nas bases de dados científicos *PubMed, ScienceDirect*, Google Acadêmico e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

Foram selecionados artigos no idioma inglês e português, utilizando como facilitador da pesquisa o operador booleano AND em associação com as palavras chaves: "*Miconia albicans*", "(*Miconia albicans*)" AND "(pharmacology)", "(*Miconia albicans*)" AND "(farmacologia)", "(*Miconia albicans*)" AND "(anti-inflammatory agents), "(*Miconia albicans*)" AND "(agente anti-inflamatório), "(*Miconia albicans*)" AND "(anti-infective agents), "(*Miconia albicans*)" AND "(ação antimicrobiana)", "(*Miconia albicans*)" AND "(antioxidant activity)", "(*Miconia albicans*)" AND "(atividade antioxidante)", "(*Miconia albicans*)" AND "(analgesic agents)", "(*Miconia albicans*)" AND "(analgésico)"; sem limitação de tempo.

Etapas para chegar na extração dos dados

A seleção dos artigos desse estudo ocorreu em três etapas, na primeira foi realizada a leitura dos títulos, seguido da segunda etapa, com a leitura dos resumos e excluídos os estudos que não preencheram os critérios propostos e, por último, a leitura aprofundada para a extração dos dados.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para a elaboração do trabalho foram estudos relacionados a planta medicinal *Miconia albicans* envolvendo seu uso popular, estudos fitoquímicos, possíveis mecanismos farmacológicos e riscos da utilização da planta, além da inclusão da presença dos diversos tipos de atividades terapêuticas encontradas; artigos, livros e capítulos de livros, disponíveis na íntegra eletronicamente nos idiomas português e inglês. Foram excluídos os estudos com informações diferentes das pretendidas.

Resultados e discussão

Foram recuperados 113 estudos, dos quais, após avaliação e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, somente 31 foram utilizados para a construção deste trabalho (figura 1).

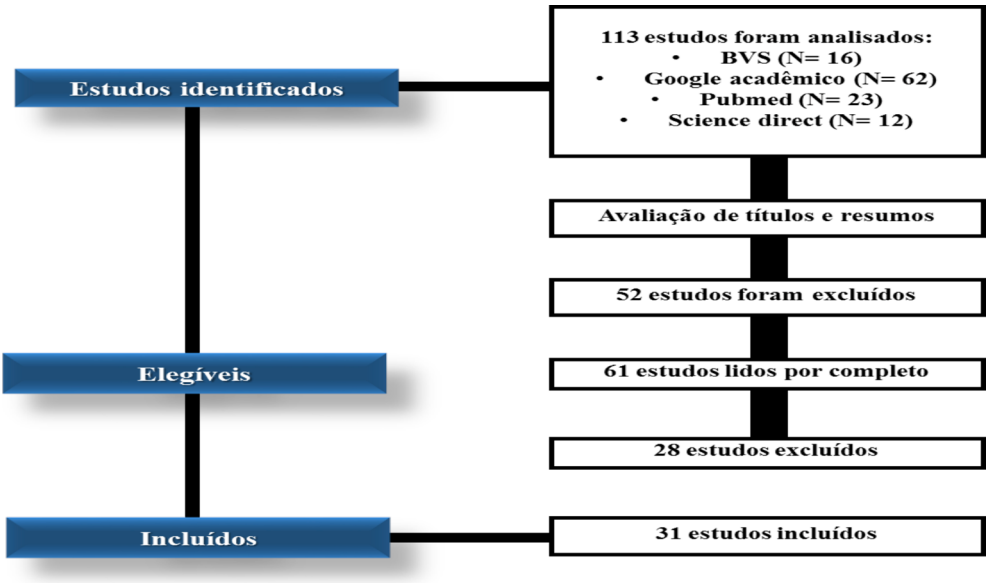


Figura 1. Processo para inclusão de artigos. Fonte: Própria autoria, 2021.

Composição fitoquímica

Com relação a composição fitoquímica, 13 artigos abordaram a presença de compostos fenólicos diversos (flavonoides, taninos, cumarinas), terpenos e alcaloides (quadro 1).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos dois anéis fenil e um ou mais substituintes de hidroxila, além disso tem um forte poder antioxidante e podem ser encontrados em frutas, legumes, chá verde e grãos integrais [10].

Os terpenos também conhecidos como isoprenoides, são classificados de acordo com a estrutura e as vias para biossíntese. Derivam de compostos inicias que apresentam 5 carbonos de dimetilalil difosfato (DMAPP) e seu isômero isopentenil difosfato (IPP), e existem sob diversas formas, dentre elas, hemiterpeno com uma única unidade, apresentando-se com 5 carbonos, para mono 10, para sesqui 15, para di 20, para sester 25, para tri 30, para tetra 40, e assim sucessivamente com os politerpenos com mais de 40 carbonos. São essenciais para as células, participando do metabolismo primário e secundário [11].

Os alcaloides são compostos, que contém nitrogênio em sua estrutura, principalmente heterocíclicos, esse nitrogênio se encontra em um estado de oxidação negativo e com um limite de distribuição entre os seres vivos [12-14].

Quadro 1. Composição fitoquímica da *Miconia albicans.*

Nº	Metodologia	Parte da planta	Metabólitos Secundários	Referência
10	Reação de Borntraeger, para a pesquisa de heterosídeos antraquinônicos; Reação da cianidina ou shinoda, reação oxalo-bórica e reação com ácido sulfúrico concentrado, reação com hidróxidos alcalinos, reação com cloreto de alumínio e reação com cloreto férrico, para a pesquisa de heterosídeos flavonoides; Determinação do índice de espuma, para pesquisa de heterosídeos saponínicos; Reação com gelatina, reação com sais metálicos e reação com hidróxidos alcalinos, para a pesquisa de taninos e reação de murexida, para pesquisa de metilxantinas.	Folhas	Compostos fenólicos: flavonoides, cumarinas e taninos; Terpenos: saponinas triterpenicas ou esteroides.	Silva *et al.* (2021) [15]
11	Reações químicas de caracterização - alcaloides, terpenos; CCD - esteróides; Espectrofotometria em UV-Vis usando a reação de Folin-Ciocalteu - Fenóis totais.	Folhas	Compostos fenólicos: taninos condensados.	Bomfim *et al.* (2020) [16]
12	Extratos da planta em clorofórmio (180g) e metanol (37,20g) foram submetidos a análises por CCD, CLAE e RMN.	Folhas	Compostos fenólicos: Quercetina-3-*O*-glicosídeo, rutina, quercetina ; Terpenos: 3- (E) -p- coumaroil-α-amirina, α-amirina, ácido epibetulínico, ácido ursólico e ácido epi-ursólico.	Pieroni *et al.* (2011) [17]

(Continua)

Nº	Metodologia	Parte da planta	Metabólitos Secundários	Referência
13	CLV, CLAE e RMN. Extratos obtidos em n-hexano, cloreto de metileno e etanol.	Partes aéreas	Terpenos: Ácido ursólico e ácido oleanólico	Vasconcelos *et al.* (2006) [18]
14	Extração por infusão da planta *in natura* e da amostra utilizada para fazer chás, os extratos passaram por CCD e CLAE acoplada a CL-IES-EM.	Folhas	Compostos fenólicos: ácido salicílico, ácido p-anísico, ácido 4-hidroximetilbenzoico, ácido protocatecuico, galangina, ácido elágico, quercetina , ácido gálico, ácido siríngico e Terpenos.	Hamann *et al.* (2020) [19]
15	Reações para identificação de heterosídeos antraquinônicos (formação de fenatos de amônio), cumarinas (hidrólise alcalina e observação em luz ultra-violeta), esteroides e triterpenos (reações de Liebermann-Burchard e Salkowski); heterosídeos digitálicos (reações de Liebermann-Burchard, Kedde e Keller-Kiliani); amido (lugol); alcaloides (reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand, Hager, ácido tânico a 01%); heterosídeos flavonoides (reação de Shinoda; oxalo-bórica; com H2SO4 conc.; com hidróxidos alcalinos; cloreto de alumínio e cloreto férrico); heterosídeos saponínicos (índice de espuma); taninos (reações com gelatina, sulfato de quinina 01%, acetato de cobre 04%, cloreto férrico 2% e hidróxido de sódio a 20%) e metilxantinas (reação de murexida), com extrato etanólico bruto e suas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila.	Folhas	Compostos fenólicos: cumarinas, taninos, heterosídeos flavonoides; Terpenos: triterpenos, heterosídeos saponínicos, desoxiaçucares (heterosídeos digitálicos).	Tomé *et al.* (2019) [6]
16	CGAR no extrato de hexano da planta.	Partes aéreas	Terpenos: β-amirina, α-amirina, β-sitosterol, estigmasterol e lupeol	Crevelin *et al.* (2006) [20]

(Continua)

Nº	Metodologia	Parte da planta	Metabólitos Secundários	Referência
17	Obtenção de extratos aquoso (através de infusão das folhas secas) e orgânico (de hexano e diclorometano). Os extratos foram submetidos a uma triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários por meio de reações químicas que resultam em alterações de cor e / ou formação de precipitados. Caracterização química foi feita por CLAE-EM.	Folhas	Compostos fenólicos: Flavona, flavonóis, flavononas, xantonas, taninos hidrolisáveis; Terpenos: triterpenóides; Alcalóides.	Alexandre *et al.* (2021) [21]
18	Foi utilizado metanol como solvente de extração, o qual passou pelo método de CLAE-TdV-EM.	Frutos	Compostos fenólicos: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos clorogênicos flavonoides, elagitaninos; Terpenos.	Corrêa *et al.* (2021) [7]
19	Foi utilizado acetato de etila como solvente de extração, para identificação dos inibidores da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B). E para a análise dos triterpenóides CLAE-EMAR-EFS-RMN.	Folhas	Compostos fenólicos: 1-*O*- (E) -cafeoil-4,6-di-*O*-galoil-β-D-glucopiranose, miricetina 3-*O*-α-L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-*O*- (2 ”-galoil) -α-L-ramnopiranosídeo, mearnsetin 3-*O*-α-L-ramnopiranosídeo, kaempferol 3-*O*-α-L-arabinopiranosídeo; Terpenos: Ácido maslínico, ácido 3-epi-sumaresinólico, sumaresinólico ácido, ácido 3-*O*-cis-p-coumaroil maslínico, ácido 3-*O*-trans-p-coumaroil maslínico, ácido 3-*O*-trans-p-coumaroil 2α-hidroxidúlcioico, ácido oleanólico e ácido ursólico.	Lima *et al.* (2018) [22]

(Continua)

Nº	Metodologia	Parte da planta	Metabólitos Secundários	Referência
20	A partir do extrato etanólico foi realizado a identificação de compostos por CLAE-DAD-IES-EM.	Folhas	Compostos fenólicos: ácido gálico, derivado de ácido elágico, miricetina-*O*-galoil-hexosídeo, miricetina-*O*-hexosídeo, quercetina-*O*-Galoil-hexosídeo, rutina, isoquercitrina, quercetina-*O*-pentosida, ácido elágico-*O*-desoxihexosídeo, quercetina-*O*-pentosida, quercetina-*O*-desoxihexose-pentosida, isorhamnetina-*O*-hexosídeo, kaempferol-*O*-pentoside, isorhamnetin-*O*-desoxihexosida, quercetina-*O*-galoil-desoxihexose, isorhamnetina-*O*-hexosídeo, pedunculagina, galato de etila, metil elágico, ácido-*O*-acetato-desoxihexosídeo, HHDP-hexosídeo e quercetina.	Quintans-Júnior *et al.* (2020) [23]

(Continua)

Nº	Metodologia	Parte da planta	Metabólitos Secundários	Referência
21	Metodologia proposta por Matos (1988) e Siqueira (2020) para avaliação qualitativa da presença dos seguintes compostos (em extrato etanólico): ácidos orgânicos, taninos, catequina, flavonoides, sesquiterpelonas, azuleno, carotenoides, cumarina, saponina, alcaloides e antraquinonas.	Folhas	Compostos fenólicos: taninos; Terpenos: azulenos e saponinas triterpenicas ou esteroides.	Costa *et al.* (2020) [24]
22	Triagem fitoquímica qualitativa foi realizada usando protocolos padrão para detecção de vários metabolitos secundários, como os esteróides, triterpenos, alcalóides, antraquinonas, glicosídeos, flavonóides, leucoantocianinas, taninos e saponinas. Foi utilizado etanol como meio extrator.	Folhas	Compostos fenólicos: Flavonóides, taninos, leucoantocianinas; Terpenos: saponinas triterpenicas e esteroides.	Lima *et al.* (2020) [25]

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Nos estudos encontraodos, a identificação dos compostos foi realizada pelos mais diversos métodos, desde reações químicas clássicas, uso de métodos instrumentais espectrofotrométricos (UV-Vis) até, diversos tipos de cromatografia: CCD (cromatografia em camada delgada), CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), CLV (cromatografia líquida à vácuo), CGAR (Cromatografia a gás de alta resolução), RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e técnicas hifenadas, Cromatografia líquida-ionização por eletrospray-espectrometria de massa *in tandem* (CL-IES-EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa de tempo de voo de quadrupolo de ultra-alto desempenho (CLAE-TdV-EM), Cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa de alta resolução-extração de fase sólida-espectroscopia de ressonância magnética nuclear (CLAE-EMAR-EFS-RMN).

A figura 2 ilustra os metabólitos secundários mais prevalentes identificados na *M. albicans.* Entre os compostos fenólicos foram encontrados flavonoides, cumarinas, taninos, xantonas e variados ácidos, mas o que se destacou nesse meio, pela sua repetida presença, foram os flavonoides.

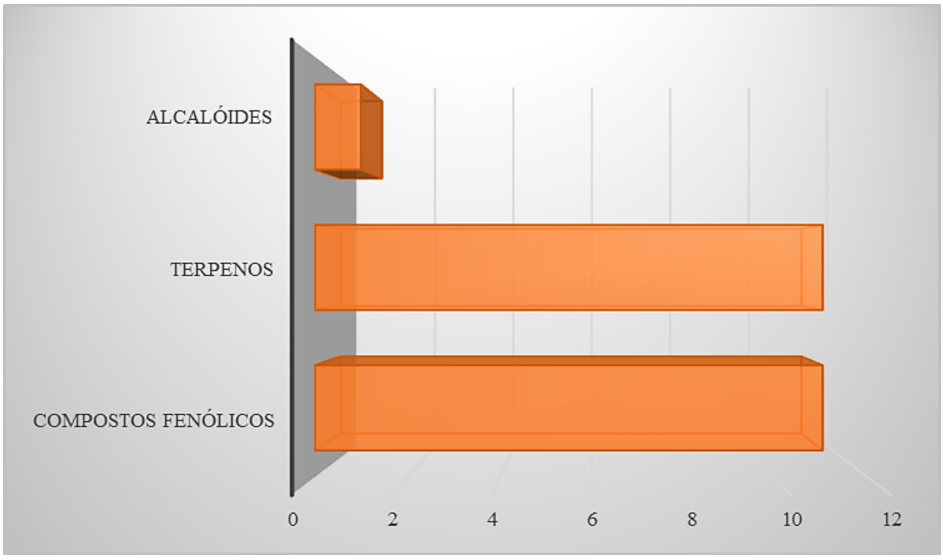


Figura 2. Metabólitos secundários mais prevalentes em *M. albicans.* Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Os flavonoides se subdividem em flavanas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e flavonas, são abundantes nas plantas entre os metabolitos secundários. Em sua maioria possuem uma estrutura fundamental, que é da seguinte forma: Um esqueleto que apresenta 15 átomos de carbono, este possui dois anéis de benzeno, uma cadeia de

três carbonos faz a ligação entre os anéis e um oxigênio como heteroátomo. Nas plantas eles auxiliam fazendo a proteção contra fungos, vírus, bactérias, insetos, dos raios ultravioletas e ainda podem causar a atração de animais polinizadores. Em relação as atividades biológicas, podem ter propriedades antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, entre outras [26].

O flavonoide mais identificado e relatado nos estudos foi a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxiflavona), que se enquadra nos flavonóis. É um flavonoide de importância científica, tendo relatados efeitos anti-inflamatório, antifúngico, antidepressivo, antioxidante *in vitro* e *in vivo*, dentre outros [27, 28].

Entre os terpenos, foram encontrados triterpenos e um sesquiterpeno, em grande maioria se destaca os triterpenos. Quimicamente os triterpenos apresentam 30 átomos de carbono, formando seis unidades de isopreno. Podem ser originados no citoplasma das células das plantas através do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato nos plastídios. Possuem um largo espectro de atividades biológicas como antioxidante, antinociceptiva, hepatoprotetora, alta seletividade anticancerígena, anti-inflamatória, antialérgica, antiangiogênica, efeito calmante e atividade antimicrobiana [29].

Entre os triterpenos mais frequentes estavam as saponinas e o ácido ursólico. As saponinas são glicosídeos, e podem ser do tipo triterpenóide, constituídas por 30 átomos de carbono ou esteroidais com 27 átomos de carbono, ou seja, três grupamentos metil a menos, ambos derivam do precursor oxidoesqualeno. Essa nomenclatura tem origem na palavra "*sapo*" em Latim, que traduzida para o português, significa "sabão", o que faz sentido, devido apresentarem a propriedade de produzir espuma, ao serem agitadas em água, isso se deve a existência na sua estrutura de grupos aglicona apolares e açúcares polares [30]. Possuem atividades antiparasitária, fungicida, moluscicida, antimicrobiana, inseticida, além disso algumas propriedades para causar efeitos hemolíticos, citotóxicos, imunomoduladores, anti-inflamatórios e antitumorais [31].

O ácido ursólico por ser um triterpenóide (pertencente a classe das saponinas triterpenicas) também possui 30 átomos de carbono em sua estrutura. Sua síntese em células vegetais se origina da ciclagem cíclica (3*S*) – oxidosqualeno [32]. Possui uma grande quantidade de atividades biológicas dentre as quais: antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, anti-ansiedade, anti-depressão, anti-esteatose e fibrose hepática, antifadiga, antidiabetes, anti-atrofia muscular, antiobesidade, antiosteoporose, auxilia no crescimento do cabelo, na proliferação de melanócitos para a produção de melanina, protege o coração e neuroproteção [33].

Em relação aos alcaloides, foi citado em um único artigo a sua presença, sem a especificação do tipo, tornando-os irrelevantes em comparação aos outros metabolitos.

Quadro 2. Uso terapêutico popular da *Miconia albicans*.

N°	Metodologia	Local	Parte da planta	Forma de uso	Uso terapêutico	Referência
1	Entrevista semiestruturada com 25 alunos do curso de engenharia florestal da UFMT.	Cuiabá/MT, Brasil	Folhas	Chá	Artrose	Pereira *et al.* (2018) [34]
2	Questionário com 30 pessoas de forma aleatória em uma clínica odontológica.	Curitiba/PR, Brasil	-	-	Artrite e artrose	Silva *et al.* (2019) [35]
3	Entrevista semiestruturada, com os comerciantes de plantas medicinais do mercado público e de uma feira livre.	Iguatu/CE, Brasil	Planta inteira	Chá	Dor na coluna	Sobrinho *et al.* (2021) [36]
4	Entrevista semiestruturada com 60 especialistas ribeirinhos em compreender o uso das plantas medicinais.	Microrregião do Norte Araguaia/ MT, Brasil	Folhas	Infusão, decocção e maceração	Artrite e dor nas costas	Ribeiro *et al.* (2017) [37]
5	Entrevista com 78 indivíduos, por meio de questionário semiestruturado.	Travessão de Minas/MG, Brasil	Folhas	-	Problemas intestinais, artrite, artrose e dor nas costas	Costa *et al.* (2021) [38]
6	Atividade, que objetivou a promoção e a valorização do saber popular sobre plantas medicinais. Participaram da atividade 22 idosos.	Pelotas/RS, Brasil	-	Unguento e massagem	Artrose	Dias *et al.* (2019) [39]

(Continua)

N°	Metodologia	Local	Parte da planta	Forma de uso	Uso terapêutico	Referência
7	Entrevista semiestruturada, com os vendedores de mercado especializado em plantas medicinais.	Recife/PE, Brasil	Caule	-	Febre e vitiligo	Albuquerque *et al.* (2007) [40]
8	Vivência, observação, conversas informais e entrevista semiestruturada com alguns voluntários do Espaço Crescer (Centro de Relações Educacional, Social e Cultural de Experiências Raras).	Alcobaça/ BA, Brasil	Folhas	Banho e chá	Dores articulares (Chikungunya)	Oliveira *et al.* (2020) [41]
9	Questionário semiestruturado com 51 idosos, na Clínica Vitalidade do Centro Universitário São Lucas.	Porto Velho/ RO, Brasil	Folhas	Infusão	Reumatismo no sangue e próstata	Viana e Ramos (2019) [42]

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Dividem-se em grupos distintos como o tropânico, quinolínico, piperidínico, e outros, sendo o de maior visibilidade o indólico [12].

Uso terapêutico popular

Entre os trabalhos relacionados ao uso popular da *Miconia albicans,* foram encontrados 9 estudos conforme apresentado no quadro 2.

Observou-se que em 8 dos 9 estudos, foi relatado o uso popular de *M. albicans* para condições relacionadas a dores articulares como artrite, artrose e dor na coluna/costas. A parte prevalente da planta utilizada foram as folhas, preparadas para uso interno principalmente na forma de chá (infusão ou decocção), também para uso externo na forma de banho e unguento para massagem.

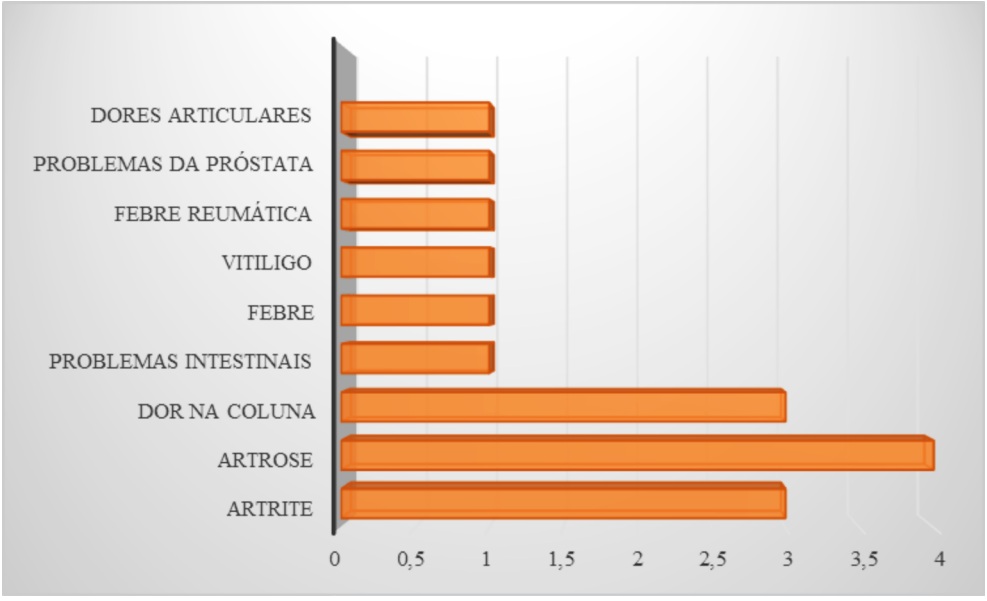


Figura 3. Resultados relacionados ao uso terapêutico da planta relatados de acordo com os artigos. Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Como mostrado na figura 3, de acordo com os relatos do uso terapêutico encontrados nos artigos, o uso da planta para artrose fica em evidência em relação aos outros resultados.

A artrose pode ser classificada de três formas, aquela resultante de uma inflamação que vem afetando o paciente a longo prazo, tendo a lesão do osso subcondral como a mais importante, é a osteoartrite do tipo artrose de causa inflamatória; a outra também pode ser decorrente de traumas que atingem a superfície articular, em que o dano é mais na

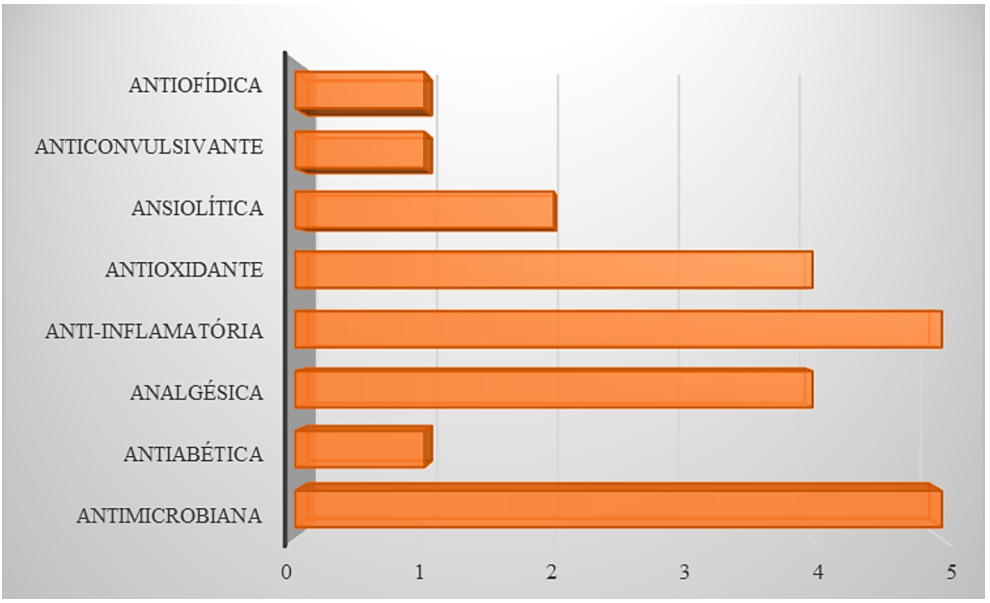


Figura 4. Resultados das atividades farmacológicas mais prevalentes de acordo com os artigos. Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

cartilagem, como acontece em fraturas e nas osteocondrites por exemplo, nomeada de artrose pós-traumática; e por último a que prejudica o osso subcondral e a cartilagem, em que pode ocorrer desvios de eixo ou instabilidades articulares, que é a artrose mecânica [43]. Os sinais presentes da artrose são a dificuldade de realizar um movimento pela manhã, de maneira transitória, dor e estalos na movimentação articular, podendo causar deficiência física [44].

Em segundo lugar a artrite, uma enfermidade em que as membranas sinoviais das articulações periféricas são afetadas, pela invasão de células do sistema imune, há uma proliferação celular no local, neovascularização e a produção de folículos linfoides germinativos, gerando uma sinovite. A sua progressão sem tratamento ou em tratamentos mal-sucedidos, pode ser a perda cartilaginosa e óssea [45, 46]. É uma doença crônica que possui a capacidade de acarretar um dano articular irreversível, que apresenta nos relatos dos pacientes mais frequentes a dor, o inchaço e a limitação dos movimentos, e ao examinar fisicamente por um profissional adequado se nota a presença de aumento do volume das articulações, calor, rubor e derrame intra-articular, entretanto nos quadris e ombros, talvez não seja possível notar esses achados [47].

Devido a sua peculiaridade de estar conforme a forma popular de fala, foi feito um esclarecimento, sobre o que é o reumatismo no sangue, como respondido pelos idosos

Quadro 3. Atividades farmacológicas da *Miconia albicans*

Atividade Antioxidante			
N°	**Amostra**	**Metodologia**	**Referência**
11	Extrato aceto etílico das folhas	Fotocolorimetria do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	Bomfim *et al.* (2020) [16]
12	Extratos clorofórmico e metanólico das folhas	Termólise do azo composto 2,2-azobis-(2-amidinopropano) (APPH) - verificação da hemólise de membranas eritrocitárias; Teste usando o radical DPPH	Pieroni *et al.* (2011) [17]
22	Extrato etanólico das folhas.	Ensaio de eliminação do radical DPPH, ensaio de eliminação do radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), ensaio de eliminação de óxido nítrico, ensaio de redução férrica/poder antioxidante (FRAP), atividade quelante do íon metálico (Fe2+), capacidade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica (TBARS).	Lima *et al.* (2020) [25]
17	Extratos aquoso (infusão das folhas secas) e orgânico (hexânico e diclorometânico).	Ensaio de eliminação do radical DPPH	Alexandre *et al.* (2021) [21]
18	Extrato metanólico do fruto	Ensaio da capacidade de redução de Folin-Ciocalteu, ensaio de eliminação do radical DPPH, ensaio de eliminação do radical ABTS, ensaio de (FRAP) e conteúdo total de flavonoides	Corrêa *et al.* (2021) [7]
29	Extrato metanol/água do fruto	Análise da captura de ABTS; Determinação do teor total de carotenoides e quantificação do teor de vitamina C.	Pasta *et al.* (2019) [50]

Atividade Antimicrobiana				
N°	Amostra	Metodologia	Micro-organismos testados	Referência
11	Extrato aceto etílico das folhas	Disco-difusão em ágar	*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Micrococus luteus* (ATCC 10240), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e o fungo *Aspergillus niger* (16404).	Bomfim *et al.* (2020) [16]

(Continua)

Atividade Antioxidante				
N°	**Amostra**	**Metodologia**		**Referência**
24	Extrato cloro metilênico das folhas	CIM - método de microdiluição em caldo.	*Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25275), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).	Cunha *et al.* (2007) [51]
25	Extrato etanólico das partes aéreas	A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar, com camada dupla de infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*-BHI)	Participaram do experimento quatro bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 35552, *Enterococcus faecalis* ATCC 19943 e *Streptococcus agalactiae*) seis gram-negativas (*Proteus mirabilis* NCTC 8309, *Escherichia coli* ATCC 14942, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11296, *Salmonella* sp ITAL SM SN 004 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e uma espécie de levedura *Candida albicans.*	Celotto *et al.* (2003) [52]
21	Extrato aquoso e etanólico das partes aéreas	Teste de disco-difusão	Bactérias enteropatogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Shiguella flexneri* (ATCC 12022).	Costa *et al.* (2020) [24]

(Continua)

Atividade Antioxidante				
N°	**Amostra**	**Metodologia**		**Referência**
15	Extrato etanólico bruto e frações aceto etilíca, diclorometânica, hexanica e aquosa das folhas	Determinação da (CIM) utilizando o teste de microdiluição seriada em caldo (CLSI/NCCLS 2012)	As bactérias gram-positivas *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria innocua (CT)* (ATCC 33090), *Listeria innocua* (QMG-13), *Listeria innocua* (QMAC-11), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Listeria monocytogenes* (24AJ3), *Listeria monocytogenes* (A10), *Listeria monocytogenes* (QMAC1), *Listeria monocytogenes* (QMAC-7), *Listeria monocytogenes* (QMG-10), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (DF2A-MC2-Sa1); e as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo *Abony* (NCTC 6017), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* (ATCC 10749), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi (CT)* (ATCC 19430), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* (ATCC 10708).	Tomé *et al.* (2019) [6]
30	Extrato metanólico das folhas	Ensaio de bioautografia e ensaio de disco-difusão em ágar.	Respectivamente fungo *Cladosporium sphaerospermum*; com as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)	Alves *et al.* (2000) [53]

(Continua)

Atividade Antioxidante			
N°	**Amostra**	**Metodologia**	**Referência**

Atividade Analgésica			
N°	Amostra	Metodologia	Referência
13	Extratos n-hexânico, cloro metilênico e etanólico das partes aéreas	Teste das contorções abdominais, e teste da formalina, os dois realizados em camundongos suíços machos.	Vasconcelos *et al.* (2006) [18]
20	Extrato etanólico das folhas	Avaliação do comportamento relacionado a dor - atividade exploratória horizontal; criação, indução de hiperalgesia mecânica e medição da força de preensão.	Quintans-Júnior *et al.* (2020) [23]
26	Extratos etanólico, cloro metilênico e hexânico das partes áereas	Testes de contorção abdominal induzida por ácido acético e de placa quente em camundongos albinos suíços machos e ratos wistar machos, respectivamente.	Vasconcelos *et al.* (2003) [54]
27	Fitoterápico em cápsulas da planta (*Miconia albicans*)	Ensaio *in vivo* no ambulatório de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Municipal Raimundo Gobira em Minas Gerais, em 9 pacientes com osteoartrite acompanhados por 30 dias.	Gomes *et al.* (2021) [55]

Atividade Anti-inflamatória			
N°	Amostra	Metodologia	Referência
13	Extratos n-hexânico, cloro metilênico e etanólico das partes aéreas	Edema induzido por carragenina em ratos Wistar machos.	Vasconcelos *et al.* (2006) [18]
20	Extrato etanólico das folhas	Indução de pleurisia por carragenina nos camundongos; Injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (ACF), determinação do diâmetro do joelho e medição das citocinas TNF-α e IL-6.	Quintans-Júnior *et al.* (2020) [23]
27	Fitoterápico em cápsulas da planta (*Miconia albicans*)	Ensaio *in vivo* no ambulatório de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Municipal Raimundo Gobira em Minas Gerais, em 9 pacientes com osteoartrite acompanhados por 30 dias.	Gomes *et al.* (2021) [55]

(Continua)

N°	Amostra	Metodologia	Referência
		Atividade Antioxidante	
18	Extrato metanólico do fruto	Modelo de edema de orelha em camundongos machos suíços induzidos pela aplicação múltipla de óleo de cróton e foi verificada a atividade da enzima mieloperoxidasa.	Corrêa *et al.* (2021) [7]
		Atividade Ansiolítica	
23	Extrato etanólico das folhas	Testes do labirinto em cruz elevado, claro-escuro e campo aberto em ratos Wistar.	Arbos *et al.* (2021) [56]
17	Extratos aquoso (infusão das folhas secas) e orgânico (hexânico e diclorometânico).	Verificação de atividades comportamentais, como comportamento locomotor em teste de campo aberto e o teste claro e escuro em peixes-zebra adultos selvagens, machos e fêmeas.	Alexandre *et al.* (2021) [21]
		Atividade Anticonvulsivante	
17	Extratos aquoso (infusão das folhas secas) e orgânico (hexânico e diclorometânico).	Indução de convulsões por pentilenotetrazol em zebrafish adultos selvagens, machos e fêmeas.	Alexandre *et al.* (2021) [21]
		Atividade Antidiabética	
19	Extrato aceto etílico das folhas	Ensaio de inibição da (PTP1B) em microplaca, e identificação de compostos que inibem essa enzima e apresentam propriedades antidiabéticas por meio de (CLAE-EMAR-EFS-RMN).	Lima *et al.* (2018) [22]
		Atividade Anti-ofídica	
28	Extrato aquoso das folhas, caules e raízes	Ensaios de inibição do veneno da cobra *Lachesis muta* em ratos Wistar machos suíços, atividade da fosfolipase A2 pelo teste hemolítico indireto, atividade de coagulação, atividade hemorrágica e atividade proteolítica.	Paula *et al.* (2010) [57]

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

no questionário do artigo de Viana e Ramos (2019) [42]. A febre reumática é uma doença em que se tem lesões inflamatórias, sem a presença de pus, elas atingem o sistema nervoso central, as articulações, o tecido celular subcutâneo e o tecido cardíaco. É uma sequela grave da infecção causada pela bactéria *Streptococcus pyogenes* (ß-hemolítico do grupo A de Lancefield), surge de uma a três semanas após uma faringo-tonsilite, em pessoas que tem tendência ao retorno da doença e por predisposição genética e apresenta caráter autoimune [48]. Essa reação autoimune, é uma espécie de hipersensibilidade, em que anticorpos que agem contra produtos e estruturas dos estreptococos, também veem as células do próprio organismo como ameaça [49].

Atividades farmacológicas

As atividades farmacológicas foram avaliadas em 18 estudos, dos quais 6 abordaram atividade antimicrobiana; 6 avaliaram atividade antioxidante; as atividades antiinflamatória e analgésica foram avaliadas em 4 estudos cada, 2 estudos avaliaram atividade ansiolítica, enquanto as atividades antidiabética, anticovulsivante e antiofídica foram avaliadas em 1 estudo cada, conforme disposto no quadro 3.

O trabalho de Bomfim *et al.* (2020) [16], apresentou resultados negativos para as atividades que foram investigadas. Cinco estudos apresentaram dados positivos para a atividade antimicrobiana [6, 24, 51-53], sendo importante observar a variação metodológica com relação ao tipo de extrato e das cepas de microrganismos testados, bem como os métodos microbiológicos empregados.

A atividade antioxidante foi descrita em cinco artigos [7, 17, 21, 25, 50], quatro estudos apresentaram resultados para atividade anti-inflamatória [7, 18, 23, 55] e analgésica [18, 23, 54, 55]; duas pesquisas relataram atividade ansiolítica [21, 56], enquanto os resultados para propriedades anticonvulsivante [21], antidiabética [22] e antiofídica [57], foram relatados em um artigo, cada (figura 4). As atividades anti-inflamatória e antimicrobiana foram as mais prevalentes.

Atividade anti-inflamatória

Vasconcelos *et al.* (2006) [18], avaliaram a atividade anti-inflamatória dos metabólitos ácido ursólico e ácido oleanólico presentes na *M. albicans*, administrados (40 mg/kg) em ratos por via oral, para a verificação da diminuição do edema de pata direita induzido por carragenina e observaram produzindo efeito anti-edematoso, quando administrados individualmente, comparável ao controle com indometacina (10 mg) enquanto a mistura dos dois (também 40 mg/kg), produziu efeito leve.

Quintans-Júnior *et al.* (2020) [23], realizou a indução de pleurisia por carragenina (100 µL de 1% m/v) e injeção intra-articular (4 injeções no joelho de 10 µL de ACF

(1 mg/mL *Mycobacterium tuberculosis* em óleo de parafina, Sigma, EUA) nos dias 0, 7, 14 e 21 de adjuvante completo de Freund nos camundongos. Para verificação da efetividade da *M. albicans*, foram administrados por via oral doses crescentes do extrato etanólico da planta (50 e 100 mg/kg), dissolvido em água destilada nos camundongos. Em relação a pleurisia, ocorreu a diminuição dos leucócitos no local da inflamação, e em relação ao diâmetro do edema formado no joelho, também houve uma diminuição.

Gomes *et al.* (2021) [55], avaliaram 9 pacientes com osteoartrite que tomaram 2 cápsulas de de *M. albicans* 500 mg ao dia por 30 dias. Outros 7 pacientes também com osteoartrite ficaram como grupo controle e tomaram 1.200 mg/dia de ibuprofeno por via oral. Após os 30 dias apenas 1 paciente do grupo da *M. albicans* apresentou derrame articular, enquanto do grupo do ibuprofeno, 3 apresentaram. Foi analisado também laboratorialmente as concentrações médias de resistina, adiponectina, leptina, sTNFR1 e sTNFR2 no líquido sinovial do joelho. Houve uma diminuição da adiponectina do grupo do ibuprofeno, enquanto houve aumento dela para o da *M. albicans*, a leptina aumentou para o do ibuprofeno e diminuiu para o da *M. albicans*, também houve diminuição da resistina no grupo da *M. albicans* e em relação a sTNFR1 e sTNFR2, houve uma diminuição para ambos.

A adiponectina, resistina e leptina são adipocitocinas, que tem sua expressão aumentada, pelas células adiposas na obesidade, e estão metabolicamente relacionadas a osteoartrite. Quando ocorre aumento da produção dessas adipocitocinas, há uma interferência na homeostase, consequentemente afetando o metabolismo de lipídeos, de glicose, à regulação da pressão arterial, à sensibilidade à insulina, as funções reprodutivas, à formação óssea e a angiogênese. Dessa forma podem ser o fator desencadeante ou agravante da osteoartrite, por meio da degradação direta da articulação ou estimulando o aparecimento de processos inflamatórios [58, 59].

OsTNFR1 e sTNFR2, são os receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), que é protagonista nos processos inflamatórios, na regulação imunológica e na apoptose, sendo assim esses receptores são indicativos de infecções e doenças inflamatórias, pois são encontrados em altas concentrações nestes casos [60].

Duas adipocitocinas diminuíram seus níveis após o tratamento com a *M. albicans,* além da diminuição dos receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa, o que mostra o quão próximo pode estar de uma efetividade similar a do ibuprofeno, que mostrou diminuição de apenas uma adipocitocina. De forma geral a *M. albicans* diminuiu os escores da dor, o derrame articular e a rigidez do joelho, na maioria dos pacientes estudados.

No estudo de Corrêa *et al.* (2021) [7], quatro grupos com 5 camundongos cada foram testados, um com a administração na orelha direita de 20 μL (2,5 mg orelha^{-1}

em solução de acetona 70%) do extrato metanólico do fruto da *M. albicans*, outro com indometacina (1 mg orelha^{-1}), outro com dexametasona (0,1 mg orelha^{-1}) e o grupo controle negativo com 20 µL de acetona. Para a verificação do efeito dessas substâncias sobre um edema induzido com a aplicação de 20 µL (200 µg orelha^{-1} em solução de acetona a 70%) de óleo de cróton na orelha. A atividade da mieloperoxidase também foi verificada. Com o tratamento tópico na dose de 2,5 mg/orelha o extrato metanólico do fruto da *M. albicans* reduziu significativamente a intensidade do edema em 58,48%, a indometacina 91,30% e a dexametasona 94,34%. De acordo com o artigo a diferença entre os medicamentos de referência para a inflamação e o extrato foi não significativo. Em relação a atividade da enzima mieloperoxidase, o extrato metanólico do fruto da *M. albicans* a reduziu em 84,48%, enquanto a indometacina em 84,51% e a dexametasona em 97,64%. A dexametasona é um glicocorticoide, com poder anti-inflamatório [61].

Atividade antimicrobiana

A respeito da atividade antimicrobiana, Cunha *et al*. (2007) [52] avaliaram metabolitos isolados das folhas de *M. albicans*, os ácidos ursólico e oleanólico, em relação ao controle (gliconato de clorexidina 0,12%), frente aos microrganismos (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*).

O ácido ursólico apresentou uma melhor (CIM) para *Streptococcus sanguinis* (50 µg/mL). O ácido oleanólico apresentou melhor (CIM) para *Enterococcus faecalis* (40 µg/mL), *Streptococcus salivarius* (30 µg/mL), *Streptococcus mitis* (40 µg/mL) e para *Streptococcus mutans* (70 µg/mL). Ambos apresentaram CIM de (50 µg/mL) para *Streptococcus sobrinus*. A mistura dos dois metabolitos, mostrou melhor resultado apenas para a *Streptococcus mitis* (30 µg/mL).

Células esféricas ou ovoides, gram-positivas, caracterizam o gênero *Streptococcus*, essas células se organizam em cadeias ou pares, que podem estar espalhadas no ambiente, como também se proliferar na pele e mucosas de humanos e animais. Sua diversidade de espécies, estão cada vez mais presentes e letais, como resultado da resistência antimicrobiana que vem se desenvolvendo, além da virulência e potencial zoonótico [62].

No estudo de Celotto *et al.* (2003) [52] a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *M. albicans* foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar. Os valores (média ± desvio padrão) em mm do halo de inibição, demostraram a sensibilidade dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (16,7 ± 1,53), *Staphylococcus saprophyticus* (13,7 ± 0,58), *Streptococcus agalactiae* (11,0 ± 0,00), *Shigella flexneri* (11,7 ± 1,15), *Klebsiella pneumoniae* (15,3 ± 0,58), e *Candida albicans* (19,7 ± 0,59).

Costa *et al.* (2020) [24] avaliaram a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, testando os extratos aquoso e etanólico da *M. albicans* sobre as seguintes bactérias enteropatogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Shiguella flexneri*.

O extrato aquoso não obteve resultado positivo, enquanto o extrato etanólico nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/mL, apresentou halos de inibição frente a *Escherichia coli* de 13,86, 14,96 e 17,22 mm, respectivamente; para *Staphylocaccus aureus*¸ inibição de 15,31, 17, 26 e 20,05 mm; para *Shigella flexneri*, 15,66, 17,32 e 18,19 mm e halo de 10,37 mm na concentração de 200 mg/mL para *Salmonela typhimurium*.

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações acetato de etila, diclorometano, hexano e aquoso da *M. albicans*, foi avaliada por Tomé *et al.* (2019) [6] através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o teste de microdiluição seriada em caldo. Para a interpretação dos resultados dos testes de atividade antimicrobiana, foi utilizado a classificação proposta por Holetz *et al*. (2002) [63]. De acordo com esta classificação, CIM abaixo de 100 µg/mL indica boa atividade inibitória; CIM de 100 a 500 µg/mL indica moderada atividade inibitória; CIM de 500 a 1000 µg/mL indica fraca atividade inibitória; acima de 1000 µg/mL indica ausência de atividade antimicrobiana.

De acordo com a classificação não houve bons resultados da CIM, apenas de moderada atividade inibitória, todos para bactérias gram positivas e na concentração de 500 µg/mL, o extrato etanólico bruto inibiu a *Listeria innocua (CT)* ATCC 33090, a fração acetato de etila inibiu o *Bacillus cereus* ATCC 14579, a *Listeria innocua (CT)* ATCC 33090, a *Listeria innocua* QMG-13, a *Listeria innocua* QMAC-11, a *Listeria monocytogenes* 24AJ3 e a *Listeria monocytogenes* A10, e a fração hexânica também inibiu a *Listeria monocytogenes* A10. Sendo assim, a fração acetato de etila, obtida do extrato etanólico bruto, a que demonstrou inibição de um maior número de bactérias.

No estudo de Alves *et al.* (2000) [53] foi realizado o ensaio de bioautografia com o fungo *Cladosporium sphaerospermum* e ensaio de disco-difusão em ágar com as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*, para testar a efetividade do extrato metanólico da *M. albicans*.

O extrato metanólico das folhas de *M. albicans*, obteve bons resultados, em que foi classificado como muito ativo, sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo um halo de inibição (> 18 mm), e ativo para *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* com um halo (entre 13-18 mm).

Possíveis mecanismos de ação

Antioxidante

Três estudos, citaram possíveis mecanismos de ação para atividade antioxidante encontrada da *M. albicans*. Pieroni *et al.* (2011) [17] apresentaram que atividade ocorre, por sequestro de radicais livres; Para Lima *et al.* (2020) [25] a ação antioxidante se deve a quebra da cadeia de radical livre através da doação de um átomo de hidrogênio (no ensaio de redução férrica/poder antioxidante (FRAP) e de outra forma os compostos de teste de eliminação competem com moléculas de oxigênio, levando à redução da produção de íons nitrito (ensaio de eliminação de óxido nítrico); Corrêa *et al.* (2021) [7], explicam que o extrato abstrai os radicais por doação de átomos de hidrogênio ou elétrons convertendo-os em espécies não reativas, mais estáveis e encerrando a reação em cadeia de radical livre e também pode quelar íons metálicos, como ferro e cobre, que participam de reações que geram radicais livres.

Tendo como exemplo um dos testes realizados nos estudos, o sequestro do radical DPPH, o mecanismo de ação é o seguinte: A substância teste, que no caso, é o extrato da *M. albicans*, age doando átomos de hidrogênio, reduzindo o DPPH em hidrazina, ocorrendo uma mudança na sua coloração de violeta a amarelo pálido [64] (Alves *et al*., 2010).

Anti-inflamatório

Quatro estudos, citaram possíveis mecanismos de ação para atividade anti-inflamatória encontrada da *M. albicans*, Vasconcelos et al. (2006) [18] relataram que os metabólitos extraídos da planta inibem enzimas da cascata do ácido araquidônico, principalmente a prostaglandina E2; Quintans-Júnior *et al.* (2020) [23] apresentaram como mecanismo de ação, o bloqueio do aumento dos níveis de IL-6 e TNF-α; para Lima *et al*. (2020) [25] ocorreu a redução dos níveis de TNF-α e IL-1β e Gomes *et al.* (2021) [55] demonstraram a diminuição dos níveis de adipocitocinas e dos receptores solúveis do TNF-α.

As prostaglandinas derivam dos eicosanoides que fazem parte do grupo dos mediadores inflamatórios, e são liberadas pela ação das ciclo-oxigenases, que derivam do ácido araquidônico, este por sua vez tem origem dos fosfolipídios da membrana celular. As prostaglandinas têm ação vasodilatadora, além de causar febre e dor, sua principal fonte de estimulo para a produção são os mastócitos e basófilos. O TNF-α, IL-6 e a IL-1β, fazem parte de outro grupo dos mediadores inflamatórios, as citocinas. O TNF-α é produzido principalmente por macrófagos, monócitos e linfócitos T, e tem a capacidade de ativar outras citocinas (forte indutor da IL-6), causar transformações metabólicas e hemodinâmicas, induzir o metabolismo muscular e caquexia, além disso possui a capacidade de estímular a liberação de moléculas de adesão, fator ativador de plaquetas,

eicosanoides, prostaglandinas E_2, glicocorticoides, ativar a coagulação e levar a apoptose celular. A IL-6 auxilia na ativação e maturação dos neutrófilos, na diferenciação e manutenção de células *natural killers* e de linfócitos-T citotóxicos e na maturação dos macrófagos, além disso pode causar febre. Pode ser produzida por células como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia. A IL-1β é capaz de ocasionar inflamação sistêmica por meio do acionamento da ciclo-oxigenase 2, que leva a formação de prostaglandinas E_2 no hipotálamo anterior, gerando febre. Também atua na produção de moléculas de adesão endotelial, óxido nítrico e a substância P (SP). É secretada quando passa por uma metabolização, pela enzima caspase-1, antes disso é uma proteína precursora (Pro-IL-1β) [65, 66].

Antidiabético

O estudo de Lima *et al.* (2018) [22], mencionou que a atividade antidiabética encontrada da *M. albicans*, se deve a inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B).

A importância da inibição dessa proteína, está relacionada a uma regulação hormonal negativa à insulina, causada aos receptores de insulina e aos substratos dos receptores, que se envolvem na sinalização da insulina, uma desfosforilação, pela sua ação catalisadora [67].

Ansiolítico

Para a atividade ansiolítica encontrada da *M. albicans*, Alexandre *et al.* (2011) [21] apresentaram uma possível relação com receptores gabaérgicos.

Um fator para o desenvolvimento, de epilepsia, dor e ansiedade, é quando ocorre alguma alteração ou deficiência do sistema GABAérgico. O ácido γ-aminobutírico (GABA), é um importantíssimo neurotransmissor do sistema nervoso central, com função inibitória. Essa inibição ocorre pelo influxo de íons cloreto para dentro da membrana de neurônios, em que estes receptores ionotrópicos do tipo GABA-A estão acoplados, após a ligação do neurotransmissor [68, 69].

Conclusão

Diante do exposto, os dados levantados na literatura científica a respeito da *Miconia albicans* até o momento revelaram que o uso popular desta planta relaciona-se majoritariamente às condições relacionadas a dores articulares e a parte prevalente da planta utilizada são as folhas, preparadas para uso interno principalmente na forma de chá, e para uso externo na forma de banho e unguento para massagem.

Quanto aos metabólitos secundários, os compostos fenólicos dentre os quais flavonoides, com visibilidade para a quercetina, e terpenos com destaque para os triterpenos,

com visibilidade para as saponinas e o ácido ursólico, destacaram-se. Além disso, entre as atividades farmacológicas investigadas encontram-se: anti-inflamatória, antimicrobiana, seguido de antioxidante, ansiolítica, anticonvulsivante, analgésica, antidiabética e propriedades antiofídicas.

A ação antioxidante pode estar ligada ao sequestro de radicais livres, quelação de íons metálicos e o poder de redução; para a atividade anti-inflamatória a inibição de enzimas da cascata do ácido araquidônico, principalmente a prostaglandina E2, bloqueio do aumento dos niveis de IL-6 e TNF-α e IL-1β e a diminuição dos níveis de adipocitocinas e dos receptores solúveis do TNF-α; para a atividade antidiabética inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) e para a ansiolítica relação com os receptores gabaérgicos.

Assim, a literatura aponta para a necessidade de mais estudos e ensaios em relação a planta, para evitar um consumo inadequado, e explorar o potencial terapêutico de forma segura e eficaz, seja para uso popular, ou desenvolvimento de novos medicamentos, pois demonstrou resultados promissores.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

1. F. Leitão, S.G. Leitão, V.S. Fonseca-Kruel, I.M. Silva, K. Martins, Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: An overview on their botanical diversity and toxicological potential, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **24**(2), 225-247 (2014).

2. S. Balbinot, P.G. Velasquez, E. Düsman, Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro – Paraná, *Rev. Bras. Plant. Med.*, **15**(4), 632-638 (2013).

3. M. Bolson, S.R. Hefler, E.I.D. Chaves, A.G. Junior, E.L.C. Cardozo Junior, Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil, *J. Ethnopharmacol.*, **161**, 1-10 (2015).

4. J.M. Serpeloni, G.R.M. Barcelos, M.P. Mori, K. Yanagui, W. Vilegas, E.A. Varanda, I.M.S. Cólus, Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from

plant species of the Miconia genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An *in vitro* analysis, *Exp. Toxicol. Pathol.*, **63**(5), 499-504 (2011).

5. E.A.P. González, Tamizaje químico y evaluación de la actividad antioxidante de hojas y frutos de tres especies del género Miconia (melastomataceae), *Revista Ciencia: Desarrollo e Innovación*, **2**(1), 43-48 (2016).

6. L.U. Tomé, H.D. Ferreira, V.F. Alves, L.G. Oliveira, L.L. Borges, S. Sá, J.R. Paula, T.S. Fiuza, Estudo morfo-anatômico, triagem fitoquímica, avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana, *J. Soc. Technol. Environ. Sci.*, **8**(2), 372-391 (2019).

7. J.G.S. Corrêa, M. Bianchin, A.P. Lopes, E. Silva, F.Q. Ames, A.M. Pomini, S.T. Carpes, J.C. Rinaldi, R.C. Melo, E.S. Kioshima, C.A. Bersani-Amado, E.J. Pilau, J.E. Carvalho, A.L.T.G. Ruiz, J.V. Visentainer, S.M.O. Santin, Chemical profile, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) fruits extract, *J. Ethnopharmacol.*, **273**, 113979 (2021).

8. A.M. Verri, A.A. Moura, V.M. Moura, Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais, *Rev. UNINGÁ Rev.*, **30**(1), 55-61 (2017).

9. F.F. Ercole, L.S. Melo, C.L.G.C. Alcoforado, Revisão integrativa versus revisão sistemática, *Rev. Min. Enferm.*, **18**(1), 9-11 (2014).

10. R.K. Singla, A.K. Dubey, A. Garg, R.K. Sharma, M. Fiorino, S.M. Ameen, M.A. Haddad, M. Al-Hiary, Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures, *J. AOAC Int.*, **102**(5), 1397-1400 (2019).

11. S.D. Tetali, Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use, *Planta*, **249(**1), 1-8 (2019).

12. J.P. Marques, G.C. Lopes, Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas, *Rev. UNINGÁ Rev.*, **24**(1), 56-61 (2015).

13. Y.P. Ng, T.C. Or, N.Y. Ip, Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, **89**, 260-270 (2015).

14. M. Ponikvar-Svet, D.N. Zeiger, J.F. Liebman, Alkaloids and selected topics in their thermochemistry, Molecules, **26**(21), 6715 (2021).

15. A.A.O. Silva, A.T.F.B. Figueredo, P.A. Santos, E.S. Belo, M.J.M.F. Souza, Análise fitoquímica e doseamento de metabólitos secundários das folhas de *Miconia albicans* (Sw) Triana coletadas de duas regiões do estado de Goiás, *Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres*, **10**(1), 71-91 (2021).

16. E.M.S. Bomfim, T.G. Santos, A.S.O. Carneiro, M.C. Silva, E.J. Marques, V.L.C. Vale, Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activites and chemical profile of species of *Miconia* Ruiz & Pav., *Clidemia* D. Don and *Tibouchina Aubl.* (Melastomataceae), *J. Med. Plant. Res.*, **14**(1), 1-6 (2020).

17. L.G. Pieroni, F.M. Rezende, V.F. Ximenes, A.L. Dokkedal, Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves, *Molecules*, **16**(11), 9439-9450 (2011).

18. M.A.L. Vasconcelos, V.A. Royo, D.S. Ferreira, A.E.M. Crotti, M.L. Andrade e Silva, J.C.T. Carvalho, J.K. Bastos, W.R. Cunha, *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae), *J. Biosci.*, **61**(7-8), 477-482 (2006).

19. B. Hamann, E.M.S. Winter, D.A. Silbert, G.A. Micke, L. Vitali, A. Tenfen, L.A. Zimmermann, Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*, *Rev. Fitos* (*Rio de Janeiro*), **14**(4), 450-461 (2020).

20. E.J. Crevelin, I.C.C. Turatti, A.E.M. Crotti, R.C.S. Veneziani, J.L.C. Lopes, N.P. Lopes, W.R. Cunha, Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, **20**(8), 827-830 (2006).

21. A.V. Alexandre, F.M. Castro, F.L.A. Batista, S.A.A.R. Santos, F.R.S. Mendes, N.G.G. Gonçalves, A.C.O. Monteiro-Moreira, A.S.Q. Souza, K.M. Canuto, F.E.A. Magalhães, A.R. Campos, Chemical profile and anxiolytic- and anticonvulsant-like effects of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*) leaves in adult zebrafish, *Pharmacogn. Mag.*, **17**(73), 146-153 (2021).

22. R.C.L. Lima, K.T. Kongstad, L. Kato, M. José Das Silva, H. Franzyk, D. Staerk, High-resolution PTP1B inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of PTP1B inhibitors from *Miconia albicans*, *Molecules*, **23**(7), 1755 (2018).

23. L.J. Quintans-Júnior, S.R. Gandhi, F. Passos, L. Heimfarth, E. Pereira, B.S. Monteiro, K.S. Santos, M.C. Duarte, L.S. Abreu, Y.M. Nascimento, J.F. Tavares, M.S.

Silva, I. Menezes, H. Coutinho, Á. Lima, G. Zengin, J. Quintans, Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI-/MS/MS, and assessment of its antihyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF-α, IL-1β and IL-6, *J. Ethnopharmacol.*, **258**, 112938 (2020).

24. R.F. Costa, R.C.A. Silva, A.I.T. Oliveira, W.L. Miranda, R.S. Pimenta, J.F.M. Silva, Avaliação antimicrobiana e toxicológica dos extratos bruto aquoso e etanólico das folhas da *Miconia albicans* (sw.) Triana sobre patógenos de origem alimentar, *Diálogos sobre Fitoterapia*, **4**, 45-56 (2020).

25. T.C. Lima, S.S. Matos, T.F. Carvalho, A.J. Silveira-Filho, L.P.S.M. Couto, L.J. Quintans-Júnior, J.S.S. Quintans, A.M.O. Silva, L. Heimfarth, F.R.S. Passos, S.R. Gandhi, B.S. Lima, F.A. Silva, Evidence for the involvement of IL-1β and TNF-α in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw. (Triana) leaves (Melastomataceae), J. Ethnopharmacol., **259**, 112908 (2020).

26. D.S. Santos, M.M.F. Rodrigues, Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão, *Estação Científica* (*UNIFAP*), **7**(3), 29-35 (2017).

27. G.T. Galo, A.C.S. Lima, K.M. Machado, L.B. Vieira, V.C. Martins, N.L. Ferreira, A.C. Lucarini, Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium ceppa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural, *J. Eng. Exact Sci.*, **4**(1), 1-10 (2018).

28. I. Holzmann, A.P. Dalmagro, C.A. Cazarin, P.L. Zimath, M.M. Souza, Envolvimento das vias de sinalização celular no efeito tipo-antidepressivo da quercetina em camundongos, *Braz. J. Health Rev.*, **3**(3), 4082-4090 (2020).

29. F.C.O. Silva, M.K.A. Ferreira, A.W. Silva, M.G.C. Matos, F. Magalhães, P.T. Silva, H.S. Santos, Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão, *Rev. Virtual Quim.*, **12**(1), 234-247 (2020).

30. T. Biswas, U.N. Dwivedi, Plant triterpenoid saponins: Biosynthesis, *in vitro* production, and pharmacological relevance, *Protoplasma*, **256**(6), 1463-1486 (2019).

31. Y. Yang, S. Laval, B. Yu, Chemical synthesis of saponins, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **71**, 137-226 (2014).

32. S. Mlala, A.O. Oyedeji, M. Gondwe, O.O. Oyedeji, Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents, *Molecules*, **24**(15), 2751 (2019).

33. W. Jinhua, Ursolic acid: Pharmacokinetics process *in vitro* and *in vivo*, a mini review, *Arch. Pharm.* (*Weinheim*), **352**(3), e1800222 (2019).

34. N.V. Pereira, L.V. Lenci, F.M.M. Santos, M.C. Pasa, Knowledge on medical plants between students of the Federal University of Mato Grosso. Cuiabá, MT, Brazil, *Biodiversity*, **17**(Special), 1-9 (2018).

35. M.F. Silva, E.M.A. Silva, F.B. Silva, L.M. Burci, Conhecimento popular sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos por moradores da área urbana de Curitiba-PR-Brasil, *Rev. Gest. Saúde*, **20**(2), 65-72 (2019).

36. A.C.N. Sobrinho, J.A. Nunes, R.U. Souza, L.S. Lucena, F.B.G. Silva, D. Fogueiredo, Estudo etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no mercado público de Iguatu-Ceará, Brasil, *Res. Soc. Dev.*, **10**(6), e14310615478 (2021).

37. R.V. Ribeiro, I.G.C. Bieski, S.O. Balogun, D.T.O. Martins, Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil, *J. Ethnopharmacol.*, **205**, 69-102 (2017).

38. I.V. Costa, F. Farisco, P.E. Gandolfi, E.R. Morais, Ethnopharmacological study of medicinal plants used by population in district of Travessão de Minas, Minas Gerais, *Int. J. Herb. Med.*, **9**(1), 127-139 (2021).

39. N.S. Dias, A.R.A. Lima, G.M. Pereira, J.B. Sousa, L.B. Lopes, R.M. Heck, Oficina da universidade aberta da pessoa idosa: compartilhando saberes sobre plantas medicinais, *Braz. J. Health Rev.*, **2**(6), 6167-6174 (2019).

40. U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, M.A. Ramos, E.L.C. Amorim, Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil, *J. Ethnopharmacol.*, **110**(1), 76-91 (2007).

41. G.L. Oliveira, C.J. Rodrigues, P.O. Santos, L.R.C. Silva, A.L. Santos, I.C. Belasco, Plantas medicinais utilizadas nas práticas integrativas e complementares de saúde no espaço crescer, Alcobaça, Bahia, *REVISE, Revista Integrativa em Inovação Tecnológica nas Ciências da Saúde*, **5**, 195-218 (2020).

42. P.O. Viana, A.C.C.A. Ramos, Utilização de plantas medicinais como ferramenta de estímulo para o resgate de cultura e qualidade de vida, *Revista Saber Científico*, **8**(1), 89 (2019).

43. G.L. Camanho, Artrose medial do joelho: Uma patologia de evolução progressiva, *Rev. Bras. Ortop.*, **56**(2), 133-137 (2021).

44. J. Martel-Pelletier, A.J. Barr, F.M. Cicuttini, P.G. Conaghan, C. Cooper, M.B. Goldring, S.R. Goldring, G. Jones, A.J. Teichtahl, J. Pelletier, Osteoarthritis, *Nat. Rev. Dis. Primers.*, **2,** 16072 (2016).

45. R.B.V. Macedo, A.M. Kakehasi, M.V.M. Andrade, Ação da IL33 na artrite reumatoide: contribuição para a fisiopatologia, *Rev. Bras. Reumatol.*, **56**(5), 451-457 (2016).

46. B.A. Nagayoshi, L.G. Lourenção, Y.N.S. Kabayose, P.M.S. Paula, M.C.O.S. Miyazaki, Artrite reumatoide: perfil de pacientes e sobrecarga de cuidadores, *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, **21**(1), 45-54 (2018).

47. L.M.H. Mota, B.A. Cruz, C.V. Brenol, I.A. Pereira, L.S. Rezende-Fronza, M.B. Bertolo, M.V.C. Freitas, N.A. Silva, P. Louzada-Junior, R.D.N. Giorgi, R.A.C. Lima, R.A. Kairalla, A.M. Kawassaki, W.M. Bernardo, G.R.C. Pinheiro, Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide, *Rev. Bras. Reumatol.*, **53**(2), 141-157 (2013).

48. G.R. Souza, A.L. Nery, C.M.V. Correa, S.E. Benedito, F.C.D.O. Kegele, K.E. Avelar, S.R. Moraes, Febre Reumática e *Streptococcus pyogenes*–uma relação perigosa, *Rev. Augustus*, 1-11 (2015). URL: https://apl.unisuam.edu.br/augustus/pdf/ed24/rev_augustus_ed_24_05.pdf.

49. A. Peixoto, L. Linhares, P. Scherr, R. Xavier, S.L. Siqueira, T.J. Pacheco, G. Venturinelli, Febre reumática: revisão sistemática, *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, **9**(3), 234-238 (2011).

50. P.C. Pasta, G. Durigan, I.C.F. Moraes, L.F. Ribeiro, C.W.I. Haminiuk, I.G. Branco, Physicochemical properties, antioxidant potential and mineral content of *Miconia albicans* (Sw.) Triana: A fruit with high aluminium content, *Rev. Bras. Bot.*, **42**(2), 209-216 (2019).

51. L.C.S. Cunha, M.L.A. Silva, N.A.J.C. Furtado, A.H.C. Vinhólis, C.H. Martins, A.A.S. Filho, W.R. Cunha, Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens, *Z. Naturforsch. C*, **62**(9-10), 668-672 (2007).

52. A.C. Celotto, D.P. Nazario, M.A. Spessoto, C.H.G. Martins, W.R. Cunha, Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three Miconia species, *Braz. J. Microbiol.*, **34**(4), 339-340 (2003).

53. T.M.A. Alves, A.F. Silva, M. Brandão, T.S.M. Grandi, E.F.A. Smânia, A.S. Júnior, C.L. Zani, Biological screening of brazilian medicinal plants, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **95**(3), 367-373 (2000).

54. M.A. Vasconcelos, D. Ferreira, M.L. Andrade e Silva, R.C. Veneziani, W.R. Cunha, Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (melastomataceae), *Boll. Chim. Farm.,* **142**(8), 333-335 (2003).

55. T. Gomes, J. Souza, L.C. Somerlate, V.A. Mendonça, N.M. Lima, G.P. Carli, S. Castro, A.S. Jesus, T. Andrade, J. Dias, M. Oliveira, C. Alves, A.P. Carli, *Miconia albicans* and Curcuma longa herbal medicines positively modulate joint pain, function and inflammation in patients with osteoarthritis: A clinical study, *Inflammopharmacology*, **29**(2), 377-391 (2021).

56. K. Arbos, J.K.S. Nader, E.N.L. Camelo, Atividade ansiolítica de extrato das folhas de *Miconia albicans*, *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*, **2**(3), 221-232 (2021).

57. R.C. Paula, E.F. Sanchez, T.R. Costa, C.H.G. Martins, P.S. Pereira, M.V. Lourenço, A.M. Soares, A.L. Fuly, Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, **16**(2), 311-323 (2010).

58. M.T.N. Santos, A.E. Freitas, J.A. Lamounier, Obesidade e osteoartrite: atualiazação em implicações clínicas e metabólicas, *Rev. Méd. Minas Gerais*, **18**(4 Suppl.1), 167-172 (2008).

59. D.M. Pacca, G.C. De-Campos, A.R. Zorzi, E.A. Chaim, J.B. De-Miranda, Prevalência de dor articular e osteoartrite na população obesa brasileira, *Arq. Bras. Cir. Dig.,* **31**(1), e1344 (2018).

60. R. Grzanka, A. Damasiewicz-Bodzek, A. Kasperska-Zajac, Tumor necrosis factor-alpha and Fas/Fas ligand signaling pathways in chronic spontaneous urticarial, *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **15**, 15 (2019).

61. R.R. Santos, A.G. Raiser, J.A. Marques, F.Z. Salbego, D.C.D.M. Müller, E.D.B. Santos Junior, A.B. Carregaro, Cloreto de sódio a 0, 9%, adicionado ou não de dexametasona, intrapleural, na prevenção de aderências pulmonares após toracotomia intercostal em cães, *Cienc. Rural*, **43**(8), 1429-1434 (2013).

62. P.S. Lannes-Costa, J. Oliveira, G. Silva-Santos, P.E. Nagao, A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp, *J. Appl. Microbiol.*, **131**(4), 1600-1620 (2021).

63. F.B. Holetz, G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A. Cortez, C.V. Nakamura, B.P. Filho, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**(7), 1027-1031 (2002).

64. C.Q. Alves, J.M. David, J.P. David, M.V. Bahia, R.M. Aguiar, Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos, *Quím. Nova*, **33**(10), 2202-2210 (2010).

65. W.M. Cruvinel, D.M. Júnior, J.A.P. Araújo, T.T.T. Catelan, A.W.S. Souza, N.P. Silva, L.E.C. Andrade, Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória, *Rev. Bras. Reumatol.*, **50**(4), 434-461 (2010).

66. C.M.B. Oliveira, R.K. Sakata, A.M. Issy, L.R. Gerola, R. Salomão, Citocinas e dor, *Rev. Bras. Anestesiol.*, **61**(2), 255-265 (2011).

67. A.P. Combs, Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity, and cancer, *J. Med. Chem.*, **53**(6), 2333-2344 (2010).

68. Z.J. Wang, T. Heinbockel, Essential oils and their constituents targeting the GABAergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases, *Molecules*, **23**(5), 1061 (2018).

69. A.N.M. Vitorazzo, A.A. Beltramo, R.G. Carvalho, F. Sousa-Gehrke, R.R.N. Ferraz, F.S.M. Rodrigues, Arsenal farmacoterapêutico disponível para o tratamento de ansiedade generalizada: revisão farmacológica e clínica, *Int. J. Health Manag. Rev.*, 7(2), 1-8 (2021).

Como citar este artigo

T.M. Silva-Lopes, G.F. Queiroga-Moraes, A.L. de Cabral-Sobreira, J.B. Pereira de Souza, Potencial farmacológico da canela-de-velho (*Miconia albicans*): Uma revisão integrativa, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 435-470 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109392

Scientific research article / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109396*

Production of a phenolic-rich extract of aroeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities

William Gustavo Lima[1*], Felipe Rocha da Silva Santos[2], Vinícius Oliveira de Faria[3], Nayara Alves de Souza[4], Luiz Pedro de Souza-Costa[2], Débora Cristina Sampaio de Assis[5], Waleska Stephanie da Cruz Nizer[6], Jaqueline Maria Siqueira Ferreira[4], Magna Cristina de Paiva[4], Júlio César Moreira Brito[3]

[1] Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[2] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[3] Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4] Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil. [5] Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[6] Carleton University, Ottawa, ON, Canada.

*Corresponding author williamgustavofarmacia@hotmail.com

ORCIDs: William Gustavo Lima (0000-0001-8946-9363), Débora Cristina Sampaio de Assis (0000-0002-3388-6501), Jaqueline Maria Siqueira Ferreira (0000-0002-1779-1975), Magna Cristina Paiva (0000-0001-9375-7261), Júlio César Moreira de Brito (0000-0003-2794-5680).

Received: April 6, 2022

Corrected: February 17, 2023

Accepted: February 21, 2023

Summary

Objective: a phenolic-rich extract of *Astronium urundeuva* honey ($PhEA^H$) was produced and its pharmacological proprieties were determined. **Method:** $PhEA^H$ was prepared using a solid-phase extraction column. Next, antibacterial and antifungal activities were evaluated by broth microdilution method and the antioxidant effect was investigated using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Urethral catheter sensitized with $PhEA^H$ were produced and its anti-adhesive and anti-biofilm effect determined. Finally, antitumoral and antiviral activities were studded using 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. **Results:** $PhEA^H$ showed an elevated total phenol concentration ($PhEA^H$: 18.7±0.4 mg GA/g

vs. fresh honey: 0.99±0.005 mg GA/g). Although PhEA^{H} did not show significant antifungal and antiviral effects, it was moderately active against Gram-negative bacilli (*Klebsiella aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*) and showed increased antibacterial activity against salmonellosis pathogens (*Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis). PhEA^{H}-impregnated urethral catheters inhibited the growth of various pathogenic bacteria and impaired the ability of *P. aeruginosa* to colonize and adhere to it. In addition to its antimicrobial activity, PhEA^{H} presented antioxidant properties and reduced the viability of human glioblastoma cells. **Conclusion:** in conclusion, our study shows that PhEA^{H} contains large amounts of phenolic compounds, which are associated with its antibacterial, anti-adhesive, antioxidant, and antitumor effects.

Keywords: Astronium urundeuva (M. Allemão) engl.; *salmonella*, glioblastoma, oxidative stress, arbovirus, coronavirus.

Resumen

Producción de un extracto rico en fenoles de miel de aroeira y caracterización de sus actividades antimicrobiana, antitumoral y antioxidante

Objetivo: se produjo un extracto rico en fenoles de miel de *Astronium urundeuva* (PhEAH) y se determinaron sus propiedades farmacológicas. **Métodos:** PhEAH se preparó utilizando una columna de extracción en fase sólida. Luego, se evaluaron las actividades antibacteriana y antifúngica mediante el método de microdilución en caldo y se investigó el efecto antioxidante mediante el ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Se fabricaron catéteres uretrales sensibilizados con PhEAH y se determinó su efecto antiadhesivo y antibiofilm. Finalmente, las actividades antitumoral y antiviral se evaluaron mediante la prueba de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). **Resultados:** PhEAH mostró una alta concentración de fenoles totales (PhEAH: 18,7±0,4 mg AG/g vs. miel fresca: 0,99±0,005 mg AG/g). Aunque PhEAH no mostró efectos antifúngicos y antivirales significativos, fue moderadamente activo contra los bacilos Gram-negativos (Klebsiella aerogenes, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*) y mostró una mayor actividad antibacteriana contra los patógenos de la salmonelosis (*Salmonella Typhimurium* y *Salmonella enteriditis*). Los catéteres uretrales impregnados con PhEAH inhibieron el crecimiento de varias bacterias patógenas y afectaron la capacidad de *P. aeruginosa* para colonizar y adherirse a ella. Además de su actividad antimicrobiana,

PhEAH mostró propiedades antioxidantes y redujo la viabilidad de las células de glioblastoma humano. **Conclusión:** en conclusión, nuestro estudio muestra que PhEAH contiene grandes cantidades de compuestos fenólicos, los cuales están asociados con sus efectos antibacterianos, antiadhesivos, antioxidantes y antitumorales.

Palabras claves: Astronium urundeuva (M. Allemão) engl.; *Salmonella*; glioblastoma; estrés oxidativo; arbovírus; coronavírus.

Resumo

Produção de um extrato rico em fenólicos do mel de aroeira e caracterização de suas atividades antimicrobiana, antitumoral e antioxidante

Objetivos: um extrato rico em fenólicos do mel de *Astronium urundeuva* (PhEAH) foi produzido e suas propriedades farmacológicas foram determinadas. **Métodos:** o PhEAH foi preparado usando uma coluna de extração em fase sólida. Em seguida, as atividades antibacteriana e antifúngica foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo e o efeito antioxidante foi investigado pelo ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Cateteres uretrais sensibilizados com PhEAH foram produzidos e seu efeito antiadesivo e antibiofilme determinado. Finalmente, as atividades antitumoral e antiviral foram avaliadas usando o teste de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). **Resultados:** PhEAH mostrou uma concentração de fenol total elevada (PhEAH: 18,7±0,4 mg GA/g vs. mel fresco: 0,99±0,005 mg GA/g). Embora o PhEAH não tenha apresentado efeitos antifúngicos e antivirais significativos, foi moderadamente ativo contra bacilos Gram-negativos (*Klebsiella aerogenes, K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*) e mostrou atividade antibacteriana aumentada contra patógenos de salmonelose (*Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*). Cateteres uretrais impregnados com PhEAH inibiram o crescimento de várias bactérias patogênicas e prejudicaram a capacidade de *P. aeruginosa* de colonizar e aderir a ela. Além de sua atividade antimicrobiana, PhEAH apresentou propriedades antioxidantes e reduziu a viabilidade de células de glioblastoma humano. **Conclusão:** em conclusão, nosso estudo mostra que o PhEAH contém grandes quantidades de compostos fenólicos, que estão associados aos seus efeitos antibacteriano, antiadesivo, antioxidante e antitumoral.

Palavras-chaves: Astronium urundeuva (M. Allemão) engl.; *salmonella*; glioblastoma; estresse oxidativo; arbovírus; coronavírus.

Introduction

Honey is a product consumed as a food all over the world. It is a rich source of various carbohydrates, mineral salts, and proteins, and also contain other compounds from the nectar collected by the bee. Indeed, honey contains large amounts of active compounds, such as flavonoids and polyphenols, which can act as antioxidant, antitumor, and antimicrobial agents [1, 2]. In this context, honey obtained during the flowering of *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. (Anacardiaceae) (formerly *Myracrodruon urundeuva* and popularly known as "aroeira-do-sertão") is a promising source of phenolic compounds that can be associated with its antimicrobial and antitumor activities. Aroeira honey is a product derived from the dry forest of northern Minas Gerais (Brazil), where only *A. urundeuva* flowers. It is known for its significant amounts of phenolic compounds [3].

Aroeira honey is moderately active against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori* [3]. However, the required concentration of Aroeira honey to inhibit the growth of these pathogens is considerably high, limiting its clinical use as a therapeutic agent. Therefore, the use of chromatographic techniques to concentrate phenolic compounds in this honey is a promising alternative [4-7]. In this study, we prepared and characterized a phenolic-rich extract of *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. (Anacardiaceae) honey ($PhEA^{H}$) and determined its antimicrobial, antitumor, and antioxidant activities. In addition, we produced an anti-biofilm urethral catheter sensitized with $PhEA^{H}$ to prevent catheter-associated urinary tract infections.

Materials and methods

Microorganisms and cells

The microorganisms used in the study were originated from the American Type Culture Collection (ATCC) and kindly provided by the Reference Microorganisms Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ; Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The antibacterial activity was investigated against *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *E. faecium* ATCC 700221, *S. pyogenes* ATCC 19615, *M. luteus* ATCC 10240, *S. aureus* ATCC 16530, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) USA300, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 43816, *K. aerogenes* ATCC 30048, *K. oxytoca* ATCC 13182, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 15290, *P. vulgaris* ATCC 13315, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 13812,

Serratia marcencens ATCC 14756, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6051, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella sonnei* ATCC 12022, and *Aeromonas hydrophila* IOC 11036. In addition, eight clinical isolates of multidrug-resistant (MDR) bacteria were included: Vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), Carbapenem-resistant *A. baumannii* AC37, Uropathogenic *E. coli* (ESBL positive), Uropathogenic *E. coli* (GyrA mutation and *qnrS1* positive), Carbapenem-resistant *P. mirabilis, Cephalosporin-resistant S. marcencens,* Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC). All isolates were identified as previously described [8-10].

The antifungal activity was determined against *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 34135, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 28707, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045, *C. gattii* ATCC 24065, *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 32763, and *R. glutinis* ATCC 26207. According to the ATCC specifications, *C. albicans* 10231 is resistant to anidulafungin, voriconazole, itraconazole, fluconazole, and ketoconazole [11].

The antiviral assays were performed against three arboviruses (i.e., Dengue virus serotype 2 (DENV-2), Zika virus (ZIKV), and Mayaro virus (MAYV)) and one betacoronavirus (Mouse hepatitis virus (MHV)). DENV-2 and ZIKV were kindly provided by Ph.D. Erna Geessien Kroon (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil) and Ph.D. Eurico de Arruda Neto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, São Paulo), respectively. MAYV was kindly provided by Ph.D. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil). MHV was kindly provided by Ph.D. Mauro Martins Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil). All arbovirus were initially propagated in C6/36 cells (Aedes albopictus clone C6/36 cells, ATCC CRL-1660) and later titrated in Vero cells (African green monkey kidney, ATCC CCL-81) by Dulbecco's plaque formation assay [12]. MHV was propagated and titrated in L929 cells (Mouse fibroblast cell line, ATCC CCL-1). Both cells (Vero and L9-29) were cultured in Dulbecco's modified minimal essential medium supplemented with 5% fetal bovine serum supplemented with antimicrobials (100 U mL^{-1} of penicillin, 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of streptomycin and 2.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of amphotericin B), and maintained at 37 °C in 5% CO_2 (Thermo Scientific™ Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO_2 Incubator, Waltham, USA).

The antitumoral activity was assessed against a neuroblast cell from human neural tissue (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266). Cells were cultured in Dulbecco's Modified

Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum, antimicrobial solution (100 U mL^{-1} of penicillin, 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of streptomycin and 2.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of amphotericin B), non-essential amino acids solution and sodium pyruvate (1 mM). Cells were maintained at 37 °C in 5% CO_2 (Thermo Scientific™ Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO2 Incubator, Waltham, USA).

Reagents

Honey samples originated from the Seasonally Dry Tropical Forest in Janaúba region, Minas Gerais, Brazil (43 ° 31 ′ 06 ″ W, 15 ° 40 ′ 34 ″ S) with annual precipitation mean of 730.46 mm and an annual temperature ranging from 15.2 to 40.2 °C (INMET 2018). Meropenem, colistin, gentamycin (Inlab, São Paulo, SP, Brazil), chloramphenicol, amphotericin B, penicillin, streptomycin (Sigma-Aldrich, San Francisco, CA, USA), vancomycin, miconazole (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), fluconazole (Fragon, São Paulo, SP, Brazil), dimethyl sulphoxide (DMSO), methanol, sodium chloride (NaCl) (Synth, São Paulo, SP, Brazil), trypsin, fetal bovine serum (Gibco, ThermoFisher ScintificScientificrt, HE, Germany), glucose (Inlab, São Paulo, SP, Brazil), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), methanol, gallic acid, and trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA) were purchased from commercial suppliers and used without additional purification. Sabouraud-Dextrose broth (SDB), Sabouraud-Dextrose agar (SDA), Mueller–Hinton broth (MHB), Mueller–Hinton agar (MHA), and Nutrient agar were purchased from Kasvi (São José do Pinhais, PR, Brazil). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was purchased from CultLab (São Paulo, SP, Brazil) and solid-phase extraction (SPE) column from Supelco-LC18 (Milan, NO, Italy).

Production of PhEA^{H}

Approximately 5 g of crude honey sample was weighed and added to 100 mL acidic solution (water and TFA 0.1%). Then, the sample was continuously stirred, and the resulting mixture was filtered twice using Whatman nº.4 and filter paper. The filtrate was applied to a solid-phase extraction (SPE) column (Supelco-LC18, Milan, Italy). Elution of phenolic compounds from the column was done with methanol and concentrated in a rotary evaporator [13].

Total phenolic compounds dosage

Total phenolic compounds of honey and extract samples were quantified using the Folin-Ciocalteu's method [14], with modifications. One g of honey and 10 mg of the PhEA^{H} were weighed and placed in a 10 mL volumetric flask, and the volume was

completed with Milli-Q water. This solution was then filtered and transferred to test tubes in triplicate. 2.5 mL of 0.2 N Folin & Ciocalteu's Phenol (Sigma) solution was added to the test tubes, which were homogenized and then allowed to rest for 5 minutes. 2 mL of 75 $g{\cdot}L^{-1}$ sodium carbonate solution was added to the samples, which were homogenized again and allowed to rest for 2 h. Then, the absorbance was measured using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu) at 760 nm, using ultrapure water as the blank. A calibration curve for the total phenolic compound was generated from a 1 $g{\cdot}L^{-1}$ standard solution of gallic acid. The standard curve presented an R^2 value of 99.8%.

Antibacterial and antifungal activity

Inoculum preparation: Microorganisms were maintained in nutrient agar and cultured after 24 (for bacteria) and 48 (for fungi) h of incubation at 37 °C. The microorganisms were collected aseptically using an inoculation loop and suspended in 10 mL of sterile saline (0.9% NaCl) to obtain the inoculum. The suspension was homogenized for approximately 10 seconds with a vortex (Bunzl Saúde, Osasco, SP, Brazil), and the optical density (OD) was measured at 530 nm (yeast) or 625 nm (bacteria) and adjusted to 0.190-0.210 in a spectrophotometer (Nova Instruments, Sao Paulo, SP, Brazil). The resulting suspensions were diluted in SDB (1:1000) to obtain an end inoculum containing 10^3 colony forming units (CFU)/mL of fungal cells or in MHB (1:100) to obtain an inoculum containing 10^6 CFU/mL of bacterial cells.

Minimum inhibitory concentration (MIC): The antibacterial and antifungal activities were evaluated by determining the MIC using the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents M07 [15] and M27 [16], respectively. Briefly, 100 µL of a microbial inoculum (10^3 CFU/mL for fungi and 10^6 CFU/mL for bacteria) was added to sterile microplates containing twofold serial dilutions (2-1,024 µg/mL) of $PhEA^H$ in MHB (for bacteria) or SDB (for fungi). Plates were then incubated for 24 h (for bacteria) or 48 h (for fungi) at 37 °C. The MIC was defined as the lowest concentration of extract that inhibited the visible growth of microorganisms. Miconazole and fluconazole were used as positive controls (1-64 µg/mL) in the antifungal assay. Meropenem, colistin, gentamycin, chloramphenicol or vancomycin were used as positive controls (1-64 µg/mL) for the antibacterial test.

Microbicidal action: The minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of $PhEA^H$ were determined as previously described by Lima *et al.* [17]. Briefly, 10 µL samples were collected from each well where no visible growth was detected in the MIC assay and plated on MHA (for bacteria) or SDA (for fungi). After incubation at 37 °C for 24 h (for bacteria) or 48 h (for fungi), the

MBC and MFC were defined as the lowest concentration of extract or controls that kills at least 99% of the inoculum compared to the untreated control.

Anti-biofilm activity in urethral catheter

Catheter sensibilization: One-centimeter (1 cm) sterile polyvinyl chloride urethral catheters (Embramed®, Cravinhos, SP, Brazil) were used. PhEA^{H} was first diluted in a solution of formic acid (79%) and orthophosphoric acid (8%). After the extract was dissolved, glycerol (18%) was added to the coating solution as a plasticizer. The catheter segments were then added to the PhEA^{H} solution at concentrations of 10 mg/mL, 100 mg/mL, and 500 mg/mL. The catheters were immersed in the coating at 45 °C for 60 minutes with agitation to ensure homogeneous coating. Then, the segments were placed in an oven at 37 °C for 48 h to dry. Finally, the catheters were washed with sterile distilled water to remove unbound substances and subjected to a new drying cycle at 37 °C for 24h.

Agar diffusion assay: The *in vitro* antimicrobial activities of 1 cm segments of all three testing concentrations of PhEA^{H} (10 mg/mL, 100 mg/mL, and 500 mg/mL) were evaluated by determining the zone of inhibition against bacteria and fungi using a modified Kirby-Bauer method [18]. Each microorganism was sub-cultured in nutrient agar for 24 h (for bacteria) or 48 h (for fungi), and a microbial suspension of 0.5 McFarland in 0.9% saline was prepared using spectrophotometric methods. Individual MHA and SDA plates were then inoculated with each bacterial and fungal suspension, respectively, so that the entire plate was covered. Segments of urethral catheters from each test group were then placed in the center of the inoculated agar plate and incubated at 37 °C for 48 h. The zones of inhibition were determined by measuring the diameter of the zones around the segments minus 10 mm (the outer diameter of each segment).

Anti-biofilm assay: The three uropathogenic microorganisms that were susceptible to PhEA^{H} in the agar diffusion assay (i.e. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) were evaluated for their ability to form viable biofilms on previously functionalized urethral catheters. Biofilm formation on sterile catheter segments treated with PhEA^{H} at 500 mg/mL was performed according to de Sousa *et al.* [19], with modifications. Briefly, the segments were immersed in tubes containing a microbial suspension (10^{6} CFU/mL) in TBS supplemented with 1 mM glucose. All tubes were incubated at 37 °C for 24 h to allow biofilm formation and adhesion to the catheter surface. Bacterial cultures were then discarded, and the catheter segments were placed in tubes containing 5 mL of sterile saline (0.9% NaCl) and shaken for 30 minutes. The segments were removed using sterilized dissecting forceps, transferred to another tube containing 5 mL of sterile saline, and sonicated at 40 KHz for 5 minutes (Soniclean, New York, NY, USA). Samples were then homogenized, and 100 µL was aliquoted, serially diluted

(10^{-1} - 10^{-6}) in sterile saline and plated on nutrient agar. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and CFU/cm of the catheter was determined by colony counting.

Antiviral activity

Cytotoxicity assay: The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was assessed by the MTT colorimetric assay [20]. Vero cells were cultured in 96-well plates (10^6 cells/well) and treated with various concentrations of $PhEA^H$ (2-1,024 μg/mL), followed by incubation at 37°C for 48 h. MTT solution (5 mg/mL) was then added to each well, and the plates were incubated at 37°C for 90 minutes. Then, 100 μL DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Tek Instruments®, Winooski, VT, USA) at 540 nm, and the CC_{50} was calculated [21].

Antiviral assay: The antiviral activity of $PhEA^H$ was evaluated as described by dos Santos *et al.* [22]. Anti-arboviral assays were performed with confluent cultures of Vero cells in 96-well plates infected with DENV-2, ZIKV, or MAYV at an infection multiplicity (MOI) of 0.1. Anti-coronavirus assays were performed in confluent cultures of L929 infected with MHV at MOI of 0.01. After infection, all plates were incubated for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 (Thermo Scientific™ Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO_2 Incubator, Waltham, USA). Then, the infected cells were treated with a twofold dilution of $PhEA^H$ prepared in DMEM (6.25-400 μg/mL) and incubated at 37 °C and 5% CO_2 for 48 h. Finally, MTT solution was added to each well, and cellular viability was determined as described above. The concentration that protected 50% of the infected and $PhEA^H$ treated cells (EC_{50}) was calculated as described by Santos *et al.* [23].

Antioxidant activity

The antioxidant activity was determined by the DPPH method, as previously described [24]. DPPH solution at 0.002% w/v in 80% methanol was used for this assay. DPPH solution (150 mL) was added to each well of a microplate, followed by 75 mL of $PhEA^H$, resulting in five concentrations: 1, 10, 100, 250 and 500 μg/mL. The plate was then covered and incubated at room temperature (25 °C), protected from light. After 30 minutes, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (Bio-Tek Instruments®, Winooski, VT, USA). The absorbance of the DPPH solution prepared at time zero was measured after incubation for 30 minutes, protected from light. Pure solvent was used as the blank. The percentage inhibition of DPPH (or percentage of antioxidant activity) was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition of DPPH} = [1 - (A_s/A_b)] \times 100$$

where A_s = absorbance of the sample and A_b = absorbance of DPPH solution.

Finally, the effective concentration for the 50% discoloration of the DPPH solution (EC_{50}) was calculated using the probit analysis method, as described by de Teixeira de Oliveira *et al.* [24].

Antitumoral activity

The inhibitory concentration to 50% of cancer cells (IC_{50}) was evaluated using the MTT colorimetric assay, as described above. SH-SY5Y cells were cultured in 96-well plates (105 cells/well) and treated with different concentrations of $PhEA^H$ (12.5-800 μg/mL) or Irinotecan hydrochloride (10 – 0.156 μg/mL), followed by incubation at 37 °C for 48 h. Next, a MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for 90 minutes. Then, 100 μL of DMSO was added to each well to solubilize formazan crystals. The absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Tek Instruments®, Winooski, VT, USA) at 540 nm, and the CC_{50} was calculated [21].

Statistical analysis

All *in vitro* tests were performed in triplicate, and the results are reported as mean ± standard deviation of these three experiments. Data regarding the anti-biofilm effect of urethral catheters sensitized with $PhEA^H$ were analyzed using Student's T-test. The statistical analyzes and graphical representations were performed using GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, Los Angeles, CA, USA).

Results

First, we applied a chromatographic method to extract phenolic compounds from the honey of *Astronium urundeuva*. The method used in this study allowed us to obtain a phenolic-rich honey extract ($PhEA^H$). The total phenolic concentration of the $PhEA^H$ was 18.7±0.4 mg GA/g sample, which was almost 20 times higher than the total phenolic concentration of *in natura* honey (0.99±0.005 mg GA/g sample).

After extracting $PhEA^H$, we evaluated its therapeutic potential as an antimicrobial, antitumor, and antioxidant agent. The antibacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by the broth microdilution method. As shown in **Table 1**, $PhEA^H$ was active against the Gram-negative bacilli *Klebsiella aerogenes* (MIC: 32 μg/mL; MBC: 256 μg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (MIC and MBC: 64-128 μg/mL), *Proteus mirabilis* (MIC and MBC: 64-128 μg/mL), *Pseudomonas aeruginosa*

(MIC and MBC: 256 μg/mL) and *Enterobacter cloacae* (MIC: 256 μg/mL; MBC: 512 μg/mL). Notably, the extract was active against an isolate of *P. mirabilis* that was highly resistant to carbapenems, suggesting that $PhEA^{H}$ exerts its activity even in multidrug-resistant pathogens (table 1). $PhEA^{H}$ was also tested against some important foodborne pathogens. According to table 2, the extract was effective against *Salmonella* Typhimurium (MIC: 16 μg/mL; MBC: 32 μg/mL) and *Salmonella* Enteritidis (MIC and MBC: 8 μg/mL). In contrast, $PhEA^{H}$ not showed antifungal (table 3) or antiviral (table 4) activity against the species included in this study.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of phenolic-rich extract from Aroeira honey ($PhEA^{H}$) against pathogenic bacteria.

Microrganisms	$PhEA^{H}$ (μg/mL)		Reference Drug (μg/mL)	
	MIC	CBM	MIC	CBM
Enterococcus faecalis ATCC 51299	>1,024	-	16#	32#
Enterococcus faecium ATCC 700221	>1,024	-	32*	32*
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	>1,024	-	0.06#	0.25#
Micrococcus luteus ATCC 10240	>1,024	-	64#	64#
Staphylococcus aureus ATCC 16530	1,024	1,024	0.25*	0.25*
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300	>1,024	-	0.5**	0.5**
Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA)[CI]	>1,024	-	8**	32**
Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	>1,024	-	1**	1**
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	512	512	0.5**	1**
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	128	128	0.06*	2*
Klebsiella pneumoniae ATCC 43816	64	64	4***	>64***
Crabapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* AC37[CI]	>1,024	-	0.5****	0.5****
Acinetobacter baumannii ATCC 19606	1,024	1,024	0.5****	4****
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	256	256	8*	8*
Enterobacter cloacae ATCC 23355	256	512	0.12*	0.12*
Klebsiella aerogenes ATCC 30048	32	256	0.25*	0.25*
Klebsiella oxytoca ATCC 13182	>1,024	-	0.25#	0.50#
Escherichia coli ATCC 8739	>1,024	-	1****	1****
Uropathogenic *Escherichia coli* (ESBL positive)[CI]	>1,024	-	0.5****	0.5****
Uropathogenic *Escherichia coli* (GyrA mutation and *qnrS1* positive)[CI]	>1,024	-	1****	1****

(*Continue*)

Microrganisms	PhEA^{H} (µg/mL)		Reference Drug (µg/mL)	
	MIC	CBM	MIC	CBM
Carbapenem-resistant *Proteus mirabilis*^{CI}	64	128	0.25*	0.25*
Proteus mirabilis ATCC 15290	128	128	8*	8*
Proteus vulgaris ATCC 13315	1,024	1,024	0.12$^{\#}$	0.25$^{\#}$
Corynebacterium diphtheriae ATCC 13812	>1,024	-	1$^{\#}$	1$^{\#}$
Serratia marcencens ATCC 14756	>1,024	-	8*	32*
Serratia marcencens^{CI}	>1,024	-	64*	>64*
Citrobacter freundii ATCC 8090	>1,024	-	4$^{\#}$	4$^{\#}$
Stenotrophomonas maltophilia ATCC 13637	>1,024	-	1$^{\#}$	1$^{\#}$
Burkholderia cepacia ATCC 17759	>1,024	-	0.25$^{\#}$	0.25$^{\#}$

Reference drug: *Meropenem; **Vancomycin; ***Chloramphenicol; ****Colistin; $^{\#}$Gentamycin

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of phenolic-rich extract from Aroeira honey (PhEAH) against relevants foodborne pathogens.

Microorganism	PhEA^{H} (µg/mL)		Reference Drug (µg/mL)	
	MIC	CBM	MIC	CBM
Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)	>1,024	-	0.25**	0.50**
Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)	>1,024	-	1**	1**
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028	16	32	≥0.06*	0.12*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076	8	8	≥0.06*	0.06*
Listeria monocytogenes ATCC 15313	>1,024	-	0.5*	0.5*
Bacillus cereus ATCC 11778	>1,024	-	0.03**	0.03**
Bacillus subtilis ATCC 6051	>1,024	-	0.125**	0.125**
Shigella flexneri ATCC 12022	>1,024	-	1**	1**
Shigella sonnei ATCC 11060	>1,024	-	0.5**	2**
Aeromonas hydrophila IOC 11036	>1,024	-	1**	1**

Reference drug: *Meropenem; **Gentamycin

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of phenolic rich extract from Aroeira honey (PhEAH) against pathogenic yeast.

Microrganismo	PhEA^{H} (μg/mL)		Reference Drug (μg/mL)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
Candida albicans ATCC 10231	>1,024	-	8*	8*
Candida dubliniensis IC1	>1,024	-	8*	32*
Candida krusei ATCC 34135	>1,024	-	4*	4*
Candida glabrata ATCC 2001	>1,024	-	0.25*	0.25*
Candida parapsilosis ATCC 22019	>1,024	-	0.5***	0.5***
Candida tropicalis ATCC 28707	>1,024	-	0.12*	0.25*
Cryptococcus neoformans ATCC 32045	>1,024	-	2**	2**
Cryptococcus gattii ATCC 24065	>1,024	-	1***	1***
Rhodotorula mucilaginosa ATCC 32763	>1,024	-	1***	1***
Rhodotorula glutinis ATCC 26207	>1,024	-	1***	1***

Reference drugs: *Miconazole; **Fluconazole

Table 4. Antiviral activity of a phenolic-rich extract from Aroeira honey (PhEA^{H}).

Virus	Cell lineage	CC_{50} (μg/mL)	EC_{50} (μg/mL)
Dengue virus sorotipo 2	Vero	668.3 ±258.6	>600
Zika virus	Vero	668.3 ±258.6	>600
Mayaro virus	Vero	668.3 ±258.6	>600
Mice Hepatitis Virus	L929	467.2 ±92.6	>600

CC_{50}: Concentration cytotoxic to 50% of cells; EC_{50}: Concentration that protected 50% of the infected cells

To evaluate the potential application of PhEA^{H} against biofilms, we investigated the ability of this extract to inhibit colonization/biofilm formation on the surface of the urethral catheter. The results shows that PhEA^{H}-impregnated catheters inhibited the growth of most bacteria tested, but no yeast was sensitive to the functionalized catheters (figure S1, supplementary material). As shown in fable 5, the anti-biofilm effect of PhEA^{H} was concentration-dependent, and the catheters exposed to the highest concentration of PhEA^{H} (500 mg/mL) presented the biggest zones of inhibition in the agar diffusion assay. The Gram-negative bacilli *K. pneumoniae* (23.00±1.41 mm) and *P. aeruginosa* (23.00±1.41 mm), and the Gram-positive cocci methicillin-resistant *S. aureus* (23.50±2.12 mm) were highly susceptible to PhEA^{H} in the diffusion test. Therefore, we investigated the ability of the PhEA^{H}-impregnated catheter to inhibit

biofilm formation by these species *in vitro*. figure 1 shows that sensitization with $PhEA^{H}$ impaired the colonization of the urethral catheter by *P. aeruginosa* ($PhEA^{H}$-impregnated catheter: 4.30±0.08 UFC/cm *vs.* Control catheter: 5.01±1.00 UFC/cm; p-value < 0.001). To our knowledge, this is the first study using urethral catheters impregnated with phenolic extracts of honey against uropathogens.

Table 5. Zones of inhibition (mm) produced by phenolic-rich extract from Aroeira honey ($PhEA^{H}$)-impregnated catheter segments in Mueller-Hinton agar.

Microorganism	$PhEA^{H}$		
	10 mg/mL	100 mg/mL	500 mg/mL
Escherichia coli K 12	-	-	13.00±1.41
ESBL-producing and quinolone-resistant	15.50±3.54	13.50±0.71	14.00±0.00
Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)	18.00±7.07	18.00±4.24	15.00±2.83
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	16.00±2.83	13.50±0.71	23.00±1.41
Klebsiella aerogenes ATCC 30048	18.00±5.66	13.50±3.54	19.00±0.00
Klebsiella oxytoca ATCC 13182	10.00±0.00	11.00±1.41	16.50±3.54
Enterococcus faecalis ATCC 51299	-	-	-
Proteus mirabilis ATCC 15290	-	15.00±0.00	14.00±0.00
Carbapenem-resistant *Proteus mirabilis*	22.00±4.24	21.50±2.12	20.00±0.00
Proteus vulgaris ATCC 13315	23.50±0.71	26.00±0.00	22.50±0.71
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	20.50±0.71	17.00±1.41	23.00±0.00
Staphylococcus aureus ATCC 16530	-	-	16.50±2.12
Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA USA 300)	18.50±0.71	18.50±2.12	23.50±2.12
Vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA)	22.00±4.24	27.50±9.19	19.50±0.71
Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	25.00±8.49	15.00±0.00	20.00±0.00
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	-	-	12.50±0.71
Streptococcus agalactiae ATCC 12386	14.00±0.00	15.00±0.00	22.00±0.00
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	-	11.50±2.12	16.00±0.00
Acinetobacter baumannii ATCC 19606	20.00±2.83	16.00±4.24	16.00±2.83
Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*	16.00±7.07	13.50±2.12	16.00±2.83
Burkholderia cepacia ATCC 17759	-	-	10.00±4.24
Stenotrophomonas maltophilia ATCC 13637	21.50±2.12	17.50±3.54	19.50±0.71
Serratia marcencens ATCC 14756	-	-	15.00±0.00
Listeria monocytogenes ATCC 15313	23.00±7.07	14.00±1.41	23.00±4.24
Bacillus cereus ATCC 11778	19.50±7.78	12.50±0.71	18.50±0.71
Bacillus subtilis ATCC 6051	22.00±1.41	15.00±1.41	20.00±4.24
Shigella flexneri ATCC 12022	22.50±3.54	27.50±0.71	23.00±0.00
Shigella sonnei ATCC 11060	22.00±4.24	26.00±0.00	22.50±3.54
Aeromonas hydrophila IOC 11036	-	10.50±0.71	13.50±0.71

(*Continue*)

Microorganism	PhEA^{H}		
	10 mg/mL	**100 mg/mL**	**500 mg/mL**
Corynebacterium diphtheriae ATCC 13812	19.50±0.71	19.50±4.95	19.00±0.00
Citrobacter freundii ATCC 8090	19.00±5.66	14.50±2.12	20.50±0.71
Enterobacter cloacae ATCC 23355	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 10240	-	-	12.00±0.00
Fungal			
Candida albicans ATCC 18804	-	-	-
Azole-resistant *Candida albicans* ATCC 10231	-	-	-
Candida krusei ATCC 34135	-	-	-
Candida glabrata ATCC 2001	-	-	-
Candida tropicalis ATCC 28707	-	-	-

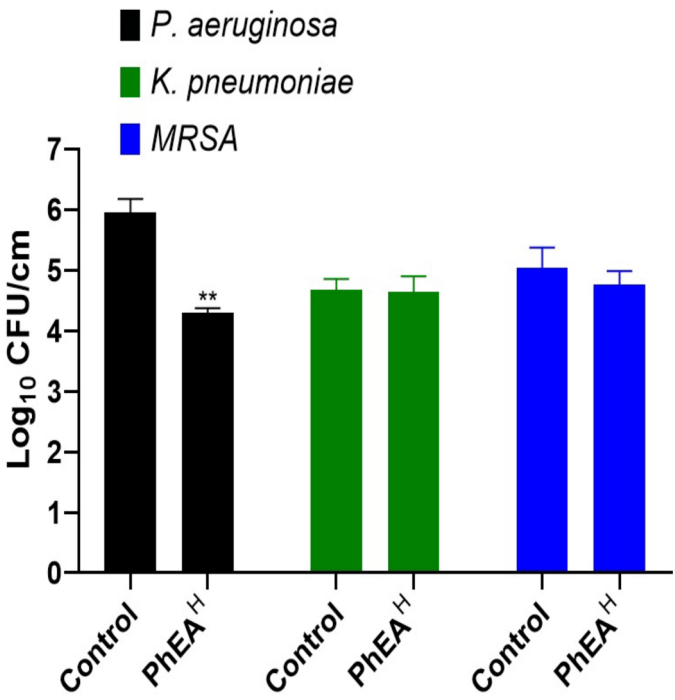


Figure 1. Anticolonization activity of phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. (PhEA^{H})-impregnated catheter segments exposed to different bacterial suspensions. Error bars indicate standard errors of the means (SEM) for bacterial colony counts per centimeter of catheter. An asterisk indicates a significant difference in mean bacterial colony counts ($P < 0.001$) between control and PhEA^{H} devices.

In addition to their known antimicrobial activity, phenolic extracts have shown the ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) *in vitro* [24]. Therefore, we investigated the potential of $PhEA^{H}$ to scavenge free radicals using the DPPH assay, which showed moderate antioxidant activity (EC_{50} 701.5±12.00 μg/mL). Since one of the main complications of oxidative stress is carcinogenesis [25], we also investigated the antitumor effects of $PhEA^{H}$ against glioblastoma *in vitro*. The results show that, at the highest concentrations tested, the extract reduced tumor cell viability, showing EC_{50} of 666.31±42.8 μg/mL.

Discussion

Honey has numerous therapeutic activities, many of which are directly linked to the presence of plant-derived phenolic compounds [1, 2]. However, the concentration of these phenolic compounds is usually low from *in natura* honey. Thus, to produce the desired therapeutic effects, a significant amount of honey would need to be used [4-7]. In this sense, our study aimed to develop a methodology for the concentration of phenolic compounds from monofloral aroeira honey, which has shown promising pharmaceutical activity [3].

Using chromatographic methods was produced a phenolic-rich extract from aroeira honey, which showed a 20 times higher concentration of phenolic compounds than *in natura* honey. Similar results were shown by Ferreira *et al.* [26] in which phenolic-rich extracts from three monofloral honeys from northeast Portugal (*Rosmarinus officinalis*, *Echium vulgare* and *Erica australis*) were obtained by chromatography in a column with Amberlite XAD-2. Using the same chromatographic column, Lianda *et al.* [5] produced phenolic-rich extracts from nine Brazilian honeys (four multifloral and five monofloral – *Citrus* sp.), which had total phenolic contents ranging from 127.2 to 766.5 mg GA/g for the extract and 0.34 to 0.78 mg GA/g for *in natura* honey. Moreover, a flavonoid-rich fraction was obtained from 33 types of honey (11 multifloral and 22 monofloral) obtained by combining chromatography on Amberlite XAD-2 and liquid-liquid extraction using diethyl ether as solvent [4].

The evaluation of the antibacterial activity of aroeira honey extract ($PhEA^{H}$) showed that it has significant antimicrobial action against Gram-negative bacteria, including to isolates that are highly resistant to antibiotics. Gram-negative bacilli cause several infections in healthcare settings, such as pneumonia, bloodstream infections, wound infections, surgical site infections, and meningitis [26, 27]. Moreover, Gram-negative bacteria are resistant to several drugs and are becoming increasingly resistant to most available antibiotics [28]. Therefore, severe infections caused by Gram-negative bacilli

have become a clinical challenge. In this context, this study shows that PhEA^{H} could be a promising source of new antimicrobial agents against these pathogens.

Another important clinical challenge is foodborne diseases, which account for 48 million cases in the United States each year. It means that 1 in 6 Americans become ill from contaminated food, resulting in an estimated 128 000 hospitalizations and 3,000 deaths annually [29]. Our study reveals that the PhEA^{H} had a potent antibacterial effect against *Salmonella* spp., one of the main foodborne pathogens. Organisms belonging to the genus *Salmonella* are flagellated rod-shaped Gram-negative facultative anaerobes that can cause non-invasive non-typhoidal salmonellosis, invasive non-typhoidal salmonellosis, and typhoid fever in humans [30]. The different types of salmonellosis are associated with more than 1,200,000 illnesses annually. Of these, at least 100,000 infections are due to antibiotic-resistant *Salmonella* [31]. The high antibacterial activity observed against the genus *Salmonella* highlights PhEA^{H} as a good option for developing effective therapies to combat salmonellosis, especially those caused by antibiotic-resistant strains.

Fungi are increasingly recognized as the cause not only of superficial infections that affect many people and are relatively easy to treat but also of invasive and disseminated infections [32]. Fungal spores contribute to significant reactive airway respiratory illness in more than 10 million people. In addition, it is estimated that more than 300 million people worldwide suffer from severe fungal infections each year, of which 1.5 million die [33]. Therefore, we investigated the antifungal activity of PhEA^{H} but no significant antifungal effect was obtained for PhEA^{H}. Viral diseases, such as dengue, Zika [34], and coronavirus [17], have affected millions of people worldwide, with significant implications to human health around the world. In this study, we have shown that PhEA^{H} is also not active against arbovirus (dengue, zika, and Mayaro virus) and beta-coronavirus (MHV).

Biofilm formation represents a protected growth mode that makes bacterial and yeast cells less susceptible to antimicrobial agents and killing by the host immune system, allowing pathogens to survive in hostile environments and spread and colonize new niches [35, 36]. The most important disease in hospital settings is catheter-associated urinary tract infection (CA-UTI), in which microorganisms form biofilms in the urinary catheter and cause recurrent or chronic urinary tract infections in hospitalized patients and the elderly in nursing homes [37]. CA-UTI is currently considered the most common type of nosocomial infection and is responsible for over 1 million cases annually [38] and over 40% of all nosocomial infections in hospitals worldwide [39]. Interestingly, our study showed that PVC-composed urethral catheter sensitized with the PhEA^{H} inhibit the growth of uropathogenic bacteria. Furthermore, these bioactive

catheters prevent adhesion and biofilm formation by important uropathogens, such as *P. aeruginosa*. These results highlight the urethral catheter sensitized with the $PhEA^{H}$ as a potential product in prevention of CA-UTI.

Finally, we showed that the $PhEA^{H}$ has a potent antioxidant effect. The biological response induced by ROS is directly related to chronic diseases that have a major impact on human health, such as cancer, neurodegenerative diseases, cancer, diabetes, metabolic disorders, atherosclerosis, and cardiovascular diseases [40]. Thus, in addition to being useful in the treatment of infectious diseases, especially caused by Gram-negative bacilli, the extract can be useful in the prophylaxis of chronic non-communicable diseases due to its antioxidant effect. Confirming this proposition, glioblastoma cells, a tumor whose etiology is known to be linked to the generation of ROS [41], were drastically affected after exposure to the $PhEA^{H}$.

Conclusion

In conclusion, $PhEA^{H}$ has proven to be a promising source of novel antibacterial agents against fermenters (*K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae, S.* Typhimurium, and *S.* Enteritidis) and non-fermenters (*P. aeruginosa*) Gram-negative bacilli. It also presented relevant antioxidant and antitumor activities. Furthermore, we showed that $PhEA^{H}$-impregnated catheters could be useful in the prophylaxis of CA-UTI by inhibiting the adhesion and colonization of important uropathogens.

Acknowledgments

W.G.L. is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) for a Ph.D. fellowship and V.O.F for the scientific initiation scholarship, as well as Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG).

Compliance with ethical standards

Funding: CNPq, CAPES and FAPEMIG.

Conflict of Interest: All authors report that they do not have any conflicts of interest.

Ethical approval: None required.

Credit author statement

W.G.L. developed the concept, design, definition of intellectual content, literature search, experimental studies, data acquisition, and data analysis of experiments related to antibacterial and antifungal activity of extract, as well as participated in manuscript preparation. V.O.F. and J.C.M.B. produced, characterized and purified the phenolic-rich extract of Aroeira honey. F.R.S.S., J.M.S.F. and L.P.S.C. contributed to the experimental studies and data acquisition related to antiviral and antitumoral activity of extract. NA.S. and M.C.P. contributed to the experimental studies, data acquisition, and data analysis related to anti-adhesive and antibiofilm effects of extract. D.C.S.A. and W.S.C.N. contributed with manuscript editing and manuscript review.

References

1. D. Cianciosi, T.Y. Forbes-Hernández, S. Afrin, M. Gasparrini, P. Reboredo-Rodriguez, P.P. Manna, J. Zhang, L.B. Lamas, S.M. Flórez, P.A. Toyos, J.L. Quiles, F. Giampieri, M. Battino, Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review, *Molecules*, **23**(9), 2322 (2018). DOI: doi.org/10.3390/molecules23092322

2. A.A. Machado De-Melo, L.B. de Almeida-Muradian, M.T. Sancho, A. Pascual-Maté, Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review, *J. Apicult. Res.*, **57**(1), 5-37 (2018). DOI: doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444

3. F.R. Viana, L.S. do Carmo, E.M.A.F. Bastos, Antibacterial activity of Aroeira honeys produced in Minas-Gerais against bacteria of clinical importance, *Acta Scient., Biol. Sci.*, **40**, 36766 (2018). DOI: doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.36766

4. F.J. Leyva-Jimenez, J. Lozano-Sanchez, I. Borras-Linares, M.L. Cadiz-Gurrea, E. Mahmoodi-Khaledi, Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria, *Lebenson. Wiss. Technol.*, **101**, 236-245 (2019). DOI: doi.org/10.1016/J.LWT.2018.11.015

5. R.L.P. Lianda, L.D. Sant'Ana, A. Echevarria, R.N. Castro, Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts, *J. Braz. Chem. Soc.*, **23**, 618-627 (2012). DOI: doi.org/10.1590/S0103-50532012000400006

6. D. Sateriale, S. Facchiano, R. Colicchio, C. Pagliuca, E. Varricchio, M. Paolucci, M.G. Volpe, P. Salvatore, C. Pagliarulo, *In vitro* synergy of polyphenolic extracts

from honey, myrtle and pomegranate against oral pathogens, *S. mutans* and *R. dentocariosa*, *Front. Microbiol*., **11**, 1465 (2020). DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2020.01465

7. P. Yap, M.F.A. Bakar, H. Lim, D. Carrier, Antibacterial activity of polyphenol-rich extract of selected wild honey collected in Sabah, Malaysia, *J. Apicult. Res.*, **54**, 163-172 (2015). DOI: doi.org/10.1080/00218839.2016.1151633

8. W.G. Lima, J.C.M. Brito, M.E. de Lima, A.C.S.T. Pizarro, M.A.M. de M. Vianna, M.C. de Paiva, D.C.S. de Assis, V.N. Cardoso, S.O.A. Fernandes, A short synthetic peptide, based on LyeTx I from Lycosa erythrognatha venom, shows potential to treat pneumonia caused by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii without detectable resistance, *J. Antibiotics*, **74**, 425-434 (2021). DOI: doi.org/10.1038/s41429-021-00421-6

9. W.G. Lima, J.C.M. Brito, V.N. Cardoso, S.O.A. Fernandes, In-depth characterization of antibacterial activity of melittin against Staphylococcus aureus and use in a model of non-surgical MRSA-infected skin wounds, *Eur. J. Pharm. Sci*., **156**, 105592 (2021). DOI: doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105592

10. M.C. Paiva, A.M.A. Nascimento, I.L.B.C. Camargo, C.I. Lima-Bittencourt, R.M.D. Nardi, The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6')-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli in Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **107**, 687-689 (2012). DOI: doi.org/10.1590/S0074-02762012000500018

11. American Type Culture Collection (ATCC), n.d. *Candida albicans* (Robin) Berkhout ATCC ® 10231TM. URL: https://www.atcc.org/products/all/10231.aspx, accessed December 1, 2021.

12. R. Dulbecco, Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*., **38**, 747-752 (1952). DOI: doi.org/10.1073/pnas.38.8.747

13. H. Sahin, R. Aliyazicioglu, O. Yildiz, S. Kolayli, A. Innocenti, C.T. Supuran, Honey, pollen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc metalloenzyme carbonic anhydrase, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*., **26**, 440-444 (2011). DOI: doi.org/10.3109/14756366.2010.503610

14. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu rea-

gent, *Methods Enzymol*., **299**, 152-178 (1999). DOI: doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

15. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11 ed., Wayne (PA), 2018, Vol. 38, M07.

16. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 7 ed., Wayne (PA), 2017, Vol. 37, M27.

17. W.G. Lima, J.C.M. Brito, W.S. da Cruz Nizer, Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2), *Phyther. Res*., **35**(2), 743-750 (2020). DOI: doi.org/10.1002/ptr.6872

18. M.D. Mansouri, T.B. Boone, R.O. Darouiche, Comparative assessment of antimicrobial activities of antibiotic-treated penile prostheses, *Eur. Urol*., **56**, 1039-1046 (2009). DOI: doi.org/10.1016/j.eururo.2008.12.020

19. J.K.T. de Sousa, J.P.A. Haddad, A.C. de Oliveira, C.D. Vieira, S.G. dos Santos, *In vitro* activity of antimicrobial-impregnated catheters against biofilms formed by KPC-producing Klebsiella pneumoniae, *J. Appl. Microbiol.*, **127**(4), 1018-1027 (2019). DOI: doi.org/10.1111/jam.14372

20. S. Roy, P. Chaurvedi, A. Chowdhary, Evaluation of antiviral activity of essential oil of *Trachyspermum Ammi* against Japanese encephalitis virus, *Pharmacognosy Res.*, **7**, 263-267 (2015). DOI: doi.org/10.4103/0974-8490.157977

21. S. Samarghandian, M.H. Boskabady, S. Davoodi, Use of *in vitro* assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in human lung cancer cell line, *Pharmacogn. Mag.*, **6**, 309-314 (2010). DOI: doi.org/10.4103/0973-1296.71799

22. M. dos Santos, T.R. Teixeira, F.R.D.S. Santos, W.G. Lima, A.C. Ferraz, N.L. Silva, F.J. Leite, J.M. Siqueira, W. Luyten, A.H.F. de Castro, J.C. de Magalhães, J.M.S. Ferreira, *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. leaves-derived extracts as potent anti-dengue serotype 2, *Nat. Prod. Res.*, **35**(16), 2804-2809 (2019). DOI: doi.org/10.1080/14786419.2019.1669030

23. F.R.S. Santos, D.A.F. Nunes, W.G. Lima, D. Davyt, L.L. Santos, A.G. Taranto, J.M.S. Ferreira, Identification of Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors by structure-based virtual screening and drug repurposing approaches, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**(2), 731-737 (2020). DOI: doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00933

24. G. Teixeira de Oliveira, J.M. Siqueira Ferreira, J.M. Lima, L. Ferreira Alves, J.M. Duarte-Almeida, L.A.R.S. Lima, Phytochemical characterisation and bio-prospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae), *Nat. Prod. Res.* **32**, 723-731 (2018). DOI: doi.org/10.1080/14786419.2017.1335727

25. S. Yamamoto, Prevention and treatment of complicated urinary tract infection, *Urol. Sci.*, **27**(4), 186-189 (2016). DOI: doi.org/10.1016/j.urols.2016.07.001

26. I.C.F.R. Ferreira, E. Aires, J.C.M. Barreira, L.M. Estevinho, Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chem.*, **114**, 1438-1443 (2009). DOI: doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.028

27. V.R. Mendes-Oliveira, M.C. Paiva, W.G. Lima, Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review, *Travel Med. Infect. Dis.*, **31**, 101459 (2019). DOI: doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015

28. D.C. Vieira, W.G. Lima, M.C. de Paiva, Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: A systematic review, *Mol. Biol. Rep*., **47**, 1471-1483 (2020). DOI: doi.org/10.1007/s11033-019-05220-9

29. A.K. Thabit, J.L. Crandon, D.P. Nicolau, Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials, *Expert Opin. Pharmacother*., **16**, 159-177 (2015). DOI: doi.org/10.1517/14656566.2015.993381

30. U.S.A. Food & Drug Administration (FDA), *Foodborne Pathogens*. URL https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens, accessed April 11, 2021.

31. J.R. Kurtz, J.A. Goggins, J.B. McLachlan, Salmonella infection: interplay between the bacteria and host immune system, *Immunology Letters*, **190**, 42-50 (2017). DOI: doi.org/10.1016/J.IMLET.2017.07.006

32. D.V.T. Nair, K. Venkitanarayanan, A.K. Johny, Antibiotic-resistant salmonella in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control, *Foods*, **7**(10), 167 (2018). DOI: doi.org/10.3390/FOODS7100167

33. J.R. Perfect, The antifungal pipeline: a reality check, *Nat. Rev. Drug Discov*., **16**, 603-616 (2017). DOI: doi.org/10.1038/nrd.2017.46

34. M.L. Rodrigues, J.D. Nosanchuk, Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials, *PLoS Negl. Trop. Dis*., **14**, e0007964 (2020). DOI: doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007964

35. D.J. Gubler, Human arbovirus infections worldwide, *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **951**, 13-24 (2006). DOI: doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x

36. R.M. Donlan, Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis*., **8**(9), 881-890 (2002). DOI: doi.org/10.3201/eid0809.020063

37. T.K. Wood, S.J. Knabel, B.W. Kwan, Bacterial persister cell formation and dormancy, *Appl. Environ. Microbiol*., **79**(23), 7116-7121 (2013). DOI: doi.org/10.1128/AEM.02636-13

38. D. Piljic, H. Porobic-Jahic, D. Piljic, S. Ahmetagic, R. Jahic, Chateter-associated urinary tract infections in adults, *Mater. Sociomed*., **25**(3), 182-186 (2013). DOI: doi.org/10.5455/msm.2013.25.182-186

39. S.M. Jacobsen, D.J. Stickler, H.L.T. Mobley, M.E. Shirtliff, Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Clin. Microbiol. Rev*., **21**(1), 26-59 (2008). DOI: doi.org/10.1128/CMR.00019-07

40. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative stress: Harms and benefits for human health, *Oxid. Med. Cell. Longev*., **2017**, 8416763 (2017). DOI: doi.org/10.1155/2017/8416763

41. M. Rinaldi, M. Caffo, L. Minutoli, H. Marini, R.V. Abbritti, F. Squadrito, V. Trichilo, A. Valenti, V. Barresi, D. Altavilla, M. Passalacqua, G. Caruso, ROS and brain gliomas: An overview of potential and innovative therapeutic strategies, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(6), 984 (2016). DOI: doi.org/10.3390/IJMS17060984

How to cite this article

W.G. Lima, F.R. da Silva-Santos, V. Oliveira de Faria, N. Alves de Souza, L.P. de Souza-Costa, D.C. Sampaio de Assis, W.S. da Cruz-Nizer, J.M. Siqueira-Ferreira, M.C. de Paiva, J.C. Moreira-Brito, Production of a phenolic-rich extract of aroeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*., **52**(1), 471-498 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109396

Production of a phenolic-rich extract of roeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities

Supplementary material

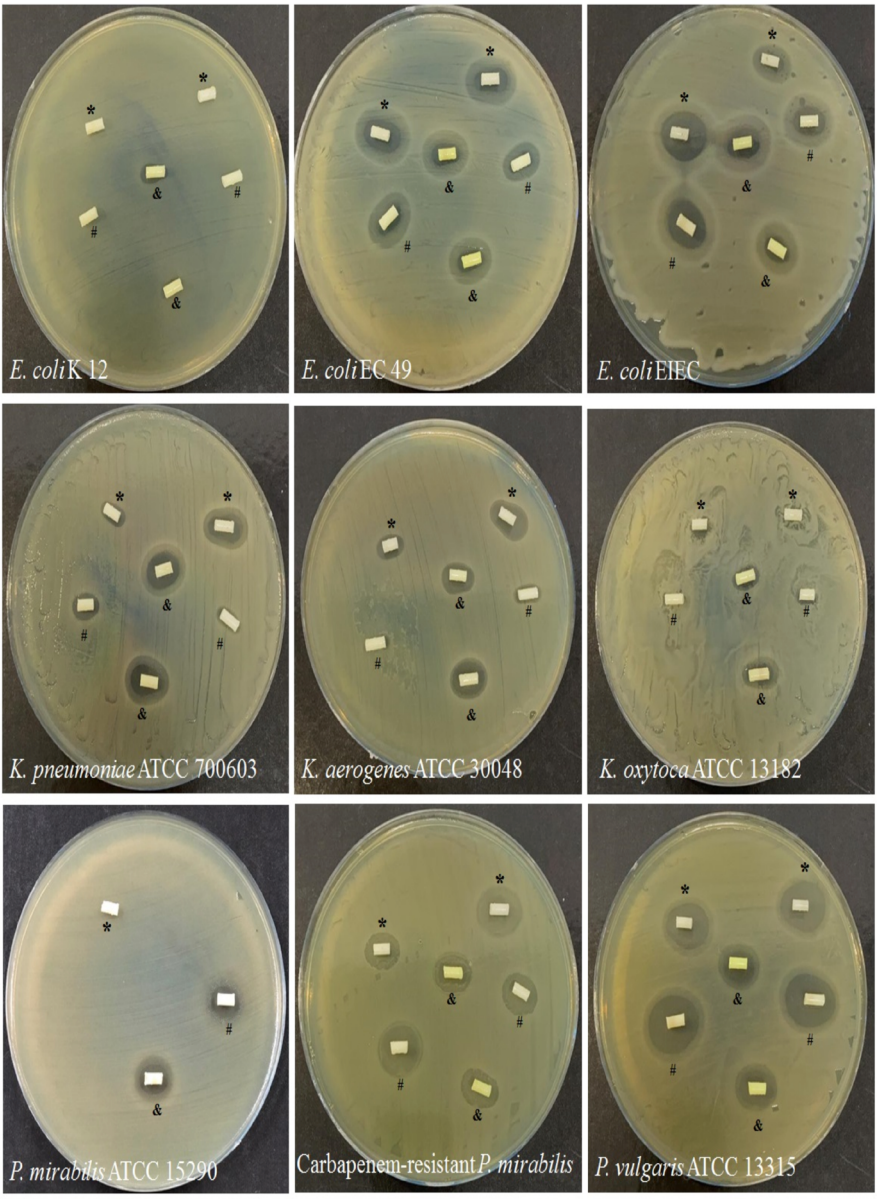


Figure S1. Zones of inhibition produced by a phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. ($PhEA^{H}$)-impregnated catheter segments.

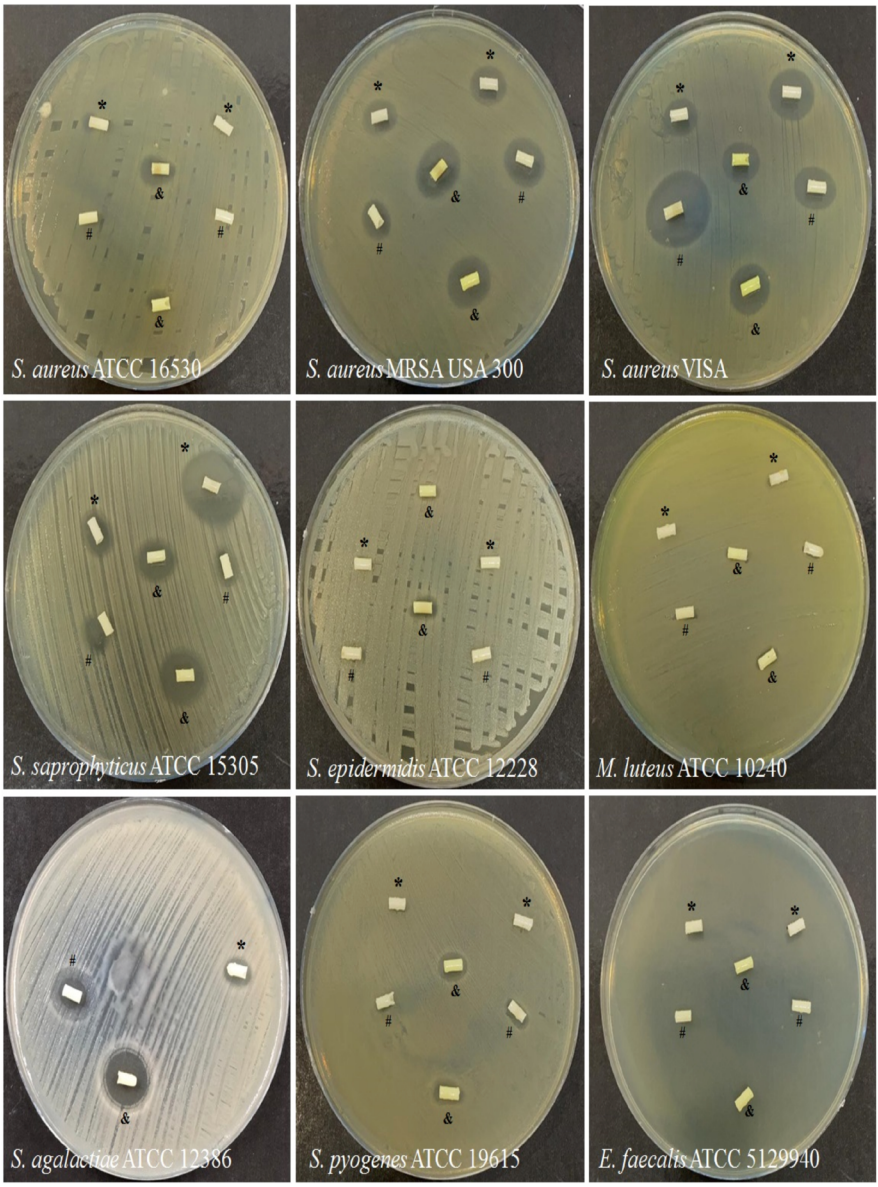


Figure S1. Zones of inhibition produced by a phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. (PhEA^{H})-impregnated catheter segments. (Continue).

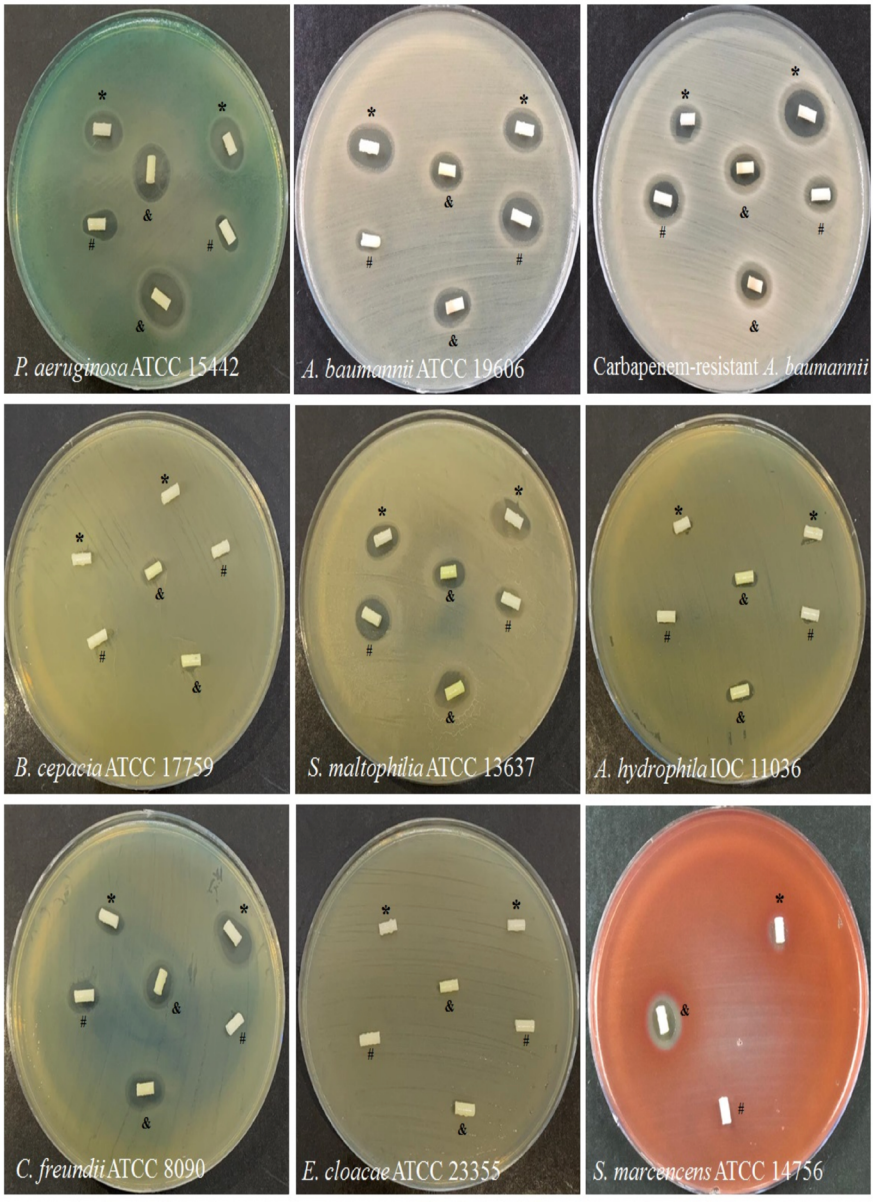


Figure S1. Zones of inhibition produced by a phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. ($PhEA^{H}$)-impregnated catheter segments. (Continue).

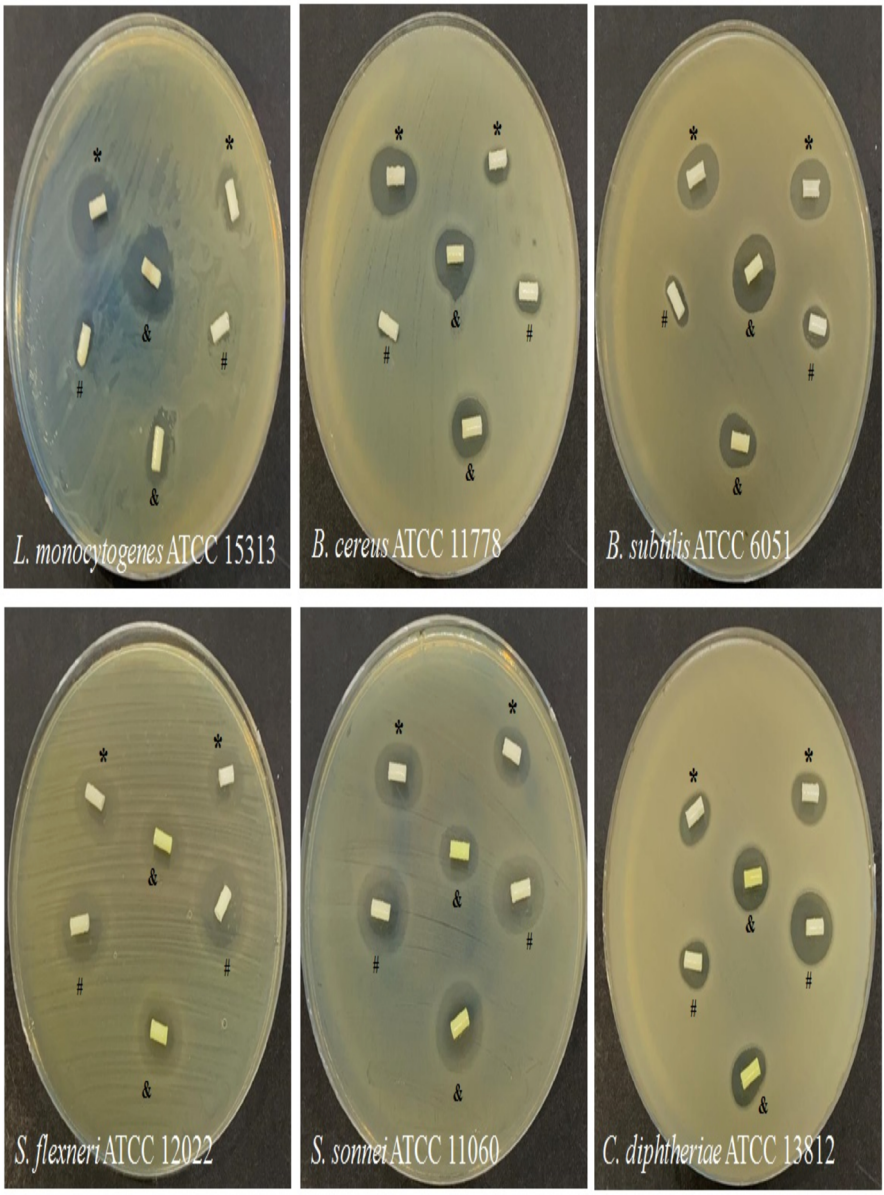


Figure S1. Zones of inhibition produced by a phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. ($PhEA^{H}$)-impregnated catheter segments. (Continue).

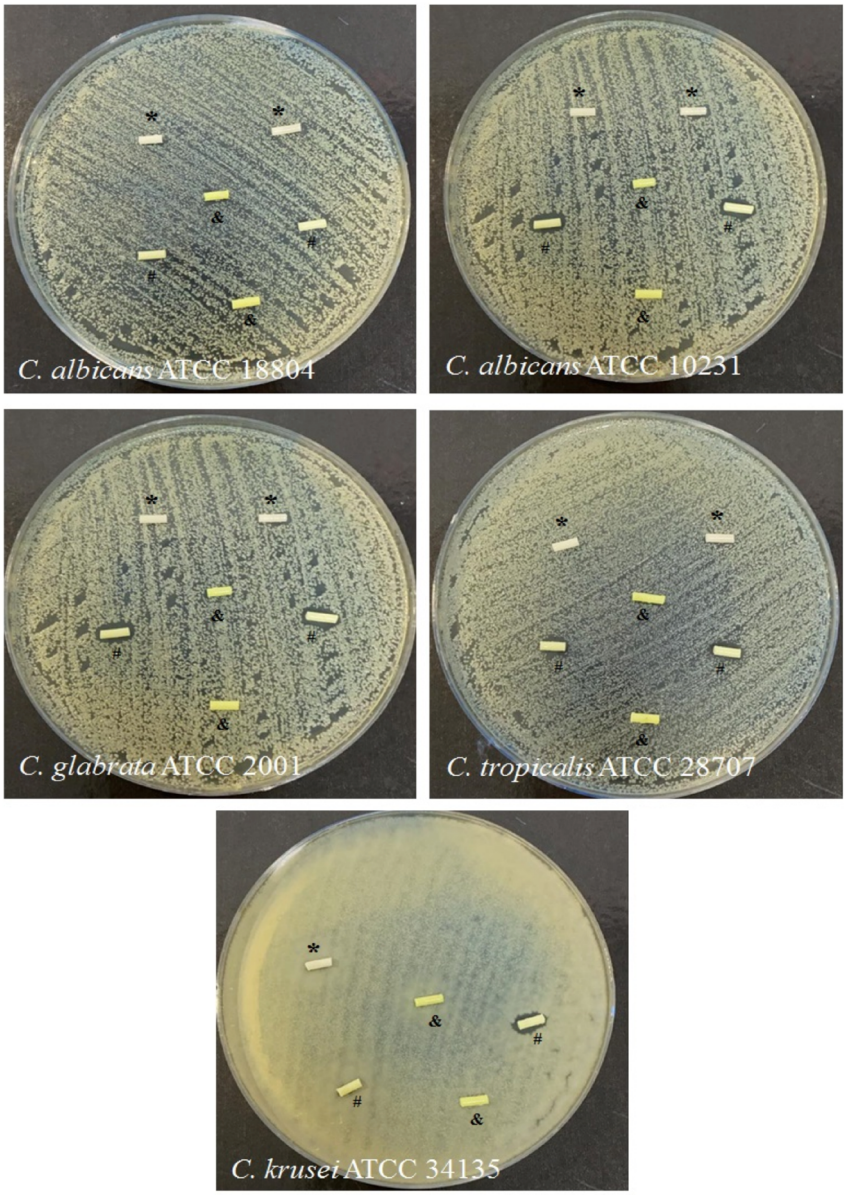


Figure S1. Zones of inhibition produced by a phenolic-rich extract from *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. ($PhEA^{H}$)-impregnated catheter segments. (Continue).

Artigo de pesquisa cientifica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.103753*

Atividade anti-*Staphylococcus aureus* e anti-*Klebsiella pneumoniae* do cinamaldeído e suas interações com ATP sintase e FtsZ através do docking molecular

Emerson Luan Andrade de Oliveira[1], Gislaine da Silva Rodrigues[2], Abrahão Alves de Oliveira Filho[3], Cássio Ilan Soares Medeiros [1,4*]

[1] Departamento de Biomedicina, Centro Universitário UniFIP, Patos, PB, Brasil.

[2] Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

[3] Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Polo: Patos, PB, Brasil.

[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

*Autor correspondente: medeiroscassio4@gmail.com, Orcid: 0000-0002-6413-8303

Recebido: 21 de julho de 2022

Revisado: 23 de fevereiro de 2023

Aceto: 26 de fevereiro de 2023

Resumo

Introdução: as infecções bacterianas tornaram-se um grande desafio na área da saúde devido ao surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes, o que levou ao aumento do interesse no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. **Objetivo:** investigar o potencial antibacteriano do cinamaldeído contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* bem como, estudar as interações desse fitoquímico com a ATP sintase e a FtsZ através do docking molecular. **Metodologia:** nos ensaios *in vitro* foram aplicados a técnica da microdiluição em placas de 96 poços para obter a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). Para os ensaios *in sílico*, o procedimento adotado foi o da ancoragem molecular com a proteína rígida (ATP sintase e a FtsZ) e o ligante flexível. **Resultados:** verificou-se uma forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* do cinamaldeído com CIM = 64 e 32 μg/mL respectivamente e CBM = 128 e 64 μg/mL respectivamente, com melhor espectro de ação contra bactérias Gram negativas. Além disso, o cinamaldeído foi capaz de ligar-se a ATP sintase e a FtsZ com energias de ΔE = -5.10 kcal/mol e ΔE = -5.20 kcal/mol de modo respectivo. **Conclusão:** o cinamaldeído apre-

senta efeito bactericida contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* e de modo preditivo esse efeito ocorre por causa das interações desse fitoquímico com a ATP sintase e a FtsZ.

Palavras-chave: Cinamaldeído, ATP sintase, atividade antibacteriana, FtsZ.

Summary

Anti-*Staphylococcus aureus* and anti-*Klebsiella pneumoniae* activity of cinnamaldehyde and its interactions with ATP synthase and FtsZ through molecular docking

Introduction: bacterial infections have become a major challenge in healthcare due to the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria, which has led to increased interest in the development of new antimicrobial agents. **Objective:** to investigate the antibacterial potential of cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* as well as to study the interactions of this phytochemical with ATP synthase and FtsZ through molecular docking. **Methodology:** in the *in vitro* assays, the microdilution technique was applied in 96-well plates to obtain the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC). For the *in silico* assays, the procedure adopted was that of molecular anchoring with the rigid protein (ATP synthase and FtsZ) and the flexible ligand. **Results:** it was found a strong antibacterial activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae* of cinnamaldehyde with MIC = 64 and 32 μg/mL respectively and CBM = 128 and 64 μg/mL respectively, with better spectrum of action against Gram negative bacteria. Furthermore, cinnamaldehyde was able to bind ATP synthase and FtsZ with energies of ΔE = -5.10 kcal/mol and ΔE = -5.20 kcal/mol respectively. **Conclusion:** Cinnamaldehyde has a bactericidal effect against *S. aureus* and *K. pneumoniae* and this effect is predictive because of the interactions of this phytochemical with ATP synthase and FtsZ.

Keywords: Cinnamaldehyde, ATP synthase, antibacterial activity, FtsZ.

Resumen

Actividad anti-*Staphylococcus aureus* y anti-*Klebsiella pneumoniae* del cinamaldehído y sus interacciones con la ATP sintasa y FtsZ a través del acoplamiento molecular

Introducción: las infecciones bacterianas se han convertido en un gran desafío en el cuidado de la salud debido a la aparición y propagación de bacterias multirresistentes, lo que ha llevado a un mayor interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. **Objetivo:** investigar el potencial antibacteriano del cinamaldehído contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, así como estudiar las interacciones de este fitoquímico con la ATP sintasa y FtsZ mediante acoplamiento molecular. **Metodología:** en los ensayos *in vitro* se aplicó la técnica de microdilución en placas de 96 pozos para obtener la concentración mínima inhibitoria y bactericida (CIM y CBM). Para los ensayos *in silico*, el procedimiento adoptado fue el de anclaje molecular con la proteína rígida (ATP sintasa y FtsZ) y el ligando flexible. **Resultados:** se encontró una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* del cinamaldehído con MIC = 64 y 32 μg/mL respectivamente y CBM = 128 y 64 μg/mL respectivamente, con mejor espectro de acción contra bacterias Gram negativas. Además, el cinamaldehído pudo unir ATP sintasa y FtsZ con energías de ΔE = -5,10 kcal/mol y ΔE = -5,20 kcal/mol respectivamente. **Conclusión:** el cinamaldehído tiene efecto bactericida contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* y este efecto es predictivo debido a las interacciones de este fitoquímico con la ATP sintasa y FtsZ.

Palabras clave: Cinamaldehído, ATP sintasa, actividad antibacteriana, FtsZ.

Introdução

As infecções bacterianas são uma grande ameaça à saúde humana, pois podem resultar em morbidade e mortalidade. Nesse contexto, dois patógenos de importância médica *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* apresentam grande capacidade de causar graves infecções. Os *S. aureus* frequentemente estão envolvidos com endocardite, septicemia, síndrome do choque tóxico e recentemente pneumonia secundária em pacientes com COVID-19 [1, 2]. *K. pneumoniae* está relacionada com infecções do trato urinário, pneumonia e bacteremia. Além disso, este microrganismo também tem sido considerado como patógeno oportunista, visto que a maioria das infecções ocorre em indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos [3].

A resistência bacteriana aos antibióticos e a consequente falha na terapêutica antimicrobiana é um problema de saúde pública presente em todos os países. Um informativo da OMS (2014), evidencia que em 2050 o setor de saúde enfrentará crises devido a infecções causadas por bactérias multirresistentes [4], e o uso indiscriminado desses fármacos em diversos setores da sociedade, colaboram para a pressão seletiva desses microrganismos multirresistentes [5]. Dessa forma, o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos impulsiona a busca por novas alternativas terapêuticas, reposicionamento de fármacos e a pesquisa de compostos com atividade antimicrobiana significativa [6]. Dentre estes, o monoterpeno cinamaldeído é o principal fitoquímico presente nas cascas das árvores do gênero *Cinnamomum* e é responsável pelo aroma e sabor da canela [7]. Além disso, diversos estudos evidenciaram sua atividade antimicrobiana, antidiabética, anti-inflamatória, nematicida e anticancerígena [8].

O cinamaldeído como antibacteriano parece afetar a integridade da membrana celular bacteriana por interferir com os níveis de ATP, além de inibir a divisão celular. Nesses aspectos, sugerem que esse fitoquímico interage com a ATP sintase bacteriana e a FtsZ um homólogo procarionte da proteína tubulina, importante para regular a divisão celular [9, 10].

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do cinamaldeído frente a cepas bacterianas de *S. aureus* e *K. pneumoniae*, bem como investigar o mecanismo de ação preditivo através de interações moleculares com a ATP sintase e a FtsZ por meio do docking molecular.

Materiais e métodos

Substâncias

O cinamaldeído ((*E*)-3-phenylprop-2-enal) (pureza > 95%), foi adquirido comercialmente da Quinarí®, Ponta Grossa, PR, Brasil. Para os ensaios de atividade antibacteriana, o volume de 12,5 µL (0,25%) do cinamaldeído foi solubilizado em 150 µL (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados de 100 µL (2%) de tween 80. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 5 mL) para obtenção de uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL e diluído em série a uma razão de dois até 2 µg/mL [11, 12].

Cepas e inóculos bacterianos

Os testes *in vitro* foram realizados com cepas bacterianas: *S. aureus* 101, 103 e 105, *K. pneumoniae* 101, 103, 104 e 105 (isolados clínicos), *S aureus* ATCC 25925, ATCC 29213 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (cepas padrão). Todas as amostras pertencem ao acervo do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) do Centro Universitário

(UniFIP). Todas as cepas foram mantidas em ágar nutriente (AN) à 4 °C. Culturas de 24 h incubadas à 37 °C foram usadas para realizar os ensaios. Posteriormente foram preparadas suspensões bacterianas a partir dessas culturas recentes em que aproximadamente 4-5 colônias foram transferidas (com alça estéril) para tubos de ensaio contendo 5,0 mL de solução salina estéril (NaCl à 0,85%). As suspensões resultantes foram agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vórtice (Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi normalizada usando uma suspensão de sulfato de bário (tubo 0,5 da escala de McFarland). A concentração final obtida foi de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL [13, 14].

Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo Brain Heart Infusion (BHI) duplamente concentrado em placas de 96 poços com fundo em "U" para obtenção de diferentes concentrações do cinamaldeído (1024-4 μg/mL). Paralelamente, controles de esterilidade, viabilidade celular e interferência dos veículos utilizados na preparação da emulsão do cinamaldeído foram realizados. A CIM é definida como a concentração mais baixa capaz de causar a inibição completa do crescimento bacteriano após 24 h à 37 °C. A atividade antimicrobiana do cinamaldeído foi interpretada conforme os seguintes critérios, para produtos naturais como extratos de plantas ou moléculas isoladas: (< 100 μg/mL) forte atividade; (> 100 à 500 μg/mL) moderada atividade; (> 500 à 1000 μg/mL) fraca atividade e (> 1000 μg/mL) produto inativo [15].

A CBM foi determinada após a leitura da CIM, retirando-se alíquotas de 10 μL do sobrenadante dos poços onde não houve crescimento visível (concentrações supraini-bitórias) (CIM, CIM × 2 e CIM × 4) e inoculando-as em novas placas de 96 poços contendo apenas BHI. Todos os controles foram então preparados e os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos por sua média geométrica. A CBM é definida como a menor concentração de um agente químico capaz de causar a morte microbiana após 24 h à 37°C [13, 16].

Docking molecular

A estrutura química do cinamaldeído foi obtida do banco de dados de ligantes Zinc (http://zinc.docking.org/substances/home/) e teve sua geometria otimizada usando o software Avogadro (v. 1.2.0/Avogadro/Pittsburgh/Pennsylvania USA), por meio do método da mecânica molecular e o campo de força MMFF94 para moléculas orgânicas. As proteínas F_1F_O ATP sintase e FtsZ foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (https://www.rcsb.org/), juntamente com seus ligantes ATP, ADP e GTP cocristalizados, apresentando os respectivos códigos: 6OQW (3,10 Å) e 5MN5 (2,80 Å), no qual para a ATP sintase foi utilizado a subunidade B para a docagem molecular.

O docking molecular foi realizado usando o software gratuito AutoDock vina (Vina, The Scripps Institute). As etapas de preparação da proteína incluíram a remoção de heteroátomos (água e íons), adição de hidrogênios polares e atribuição de cargas. Os sítios ativos foram delineados em torno do ligante cocristal usando Grid Boxes de tamanhos apropriados. O processo de validação do docking foi baseado no redocking, que consiste em refletir a posição e orientação do ligante encontrado na estrutura cristalográfica. Assim, o valor do Root Mean Square Deviation (RMSD) deve ser ≤ 2,0 Å. Portanto, o procedimento adotado foi o da ancoragem molecular com a proteína rígida (sem alterações nas posições dos átomos) e o ligante flexível [17, 18].

A visualização e preparação da estrutura cristalográfica das proteínas e do ligante para o redocking e o docking foram realizados no software PyMOL™ 2.0 (Schrödinger LLC), e Discovery Studio (DS) Visualizer (v.4.1) (Accelrys Software Inc., EUA).

Resultados e discussões

CIM e CBM

Os isolados clínicos utilizados no presente estudo apresentaram uma forte susceptibilidade ao cinamaldeído, com CIM's abaixo de 100μg/mL de acordo com Morales *et al.* (2008) [15]. Os três isolados clínicos de *S. aureus* apresentaram uma CIM de 64 μg/mL e CBM de 128 μg/mL. Resultados iguais são observados nas cepas padrões ATCC (25925/29213) testadas. Dessa forma, o efeito da substância foi classificado como bactericida segundo a razão CBM/CIM ≤ 4 [19, 20] (tabela 1).

Tabela 1. Efeito bactericida do cinamaldeído contra cepas de *S. aureus*.

Cepas	Cinamaldeído			
	CIM	**CBM**	**CBM/CIM**	**Efeito**
***S. aureus* 101**	64	128	2	Bactericida
***S. aureus* 103**	64	128	2	Bactericida
***S. aureus* 105**	64	128	2	Bactericida
***S. aureus* ATCC 25925**	64	128	2	Bactericida
***S. aureus* ATCC 29213**	64	128	2	Bactericida

CIM e CBM: μg/mL

O estudo de Fero *et al.* (2016) [21] avaliou o potencial inibitório do cinamaldeído em isolados clínicos de *S. aureus.* Para o ensaio, foram utilizados quatro isolados clínicos e duas cepas ATCC (25923/6538), seguindo o protocolo da CLSI 2015 para a determinação da CIM. Pode-se observar que para os quatro isolados clínicos e a cepa ATCC

6538 a CIM foi de 250 μg/mL e para a cepa ATCC 625923 foi 500 μg/mL. Além disso, a CBM para as cepas ATCC's foram de 1000 μg/mL. Também, foi evidenciado que concentrações subinibitórias de cinamaldeído diminuiu a sobrevivência dos *S. aureus* no soro humano e a inibição completa da adesão dos microrganismos ao látex. Estes achados podem tornar possível o uso futuro desta substância na produção de materiais hospitalares, como cateteres, a fim de prevenir a adesão de *S. aureus* a estes aparatos.

Wang *et al.* (2021) [22] avaliaram a atividade antimicrobiana do cinamaldeído sobre dois isolados clínicos de *S. aureus* multirresistentes e na cepa ATCC 33591, seguindo o protocolo da CLSI 2017. Estes autores encontraram uma CIM de 250 μg/mL para os dois isolados clínicos, bem como para a cepa ATCC. Este estudo avaliou também possíveis interações farmacológicas, a fim de obter um sinergismo e uma reversão da resistência microbiana. Dentre os fármacos padrões testados, à amicacina foi o fármaco que apresentou o melhor resultado de sinergismo, tornando os isolados resistentes susceptíveis ao fármaco quando administrado em associação com o cinamaldeído, demonstrando assim sua atividade antibacteriana também em isolados multirresistentes.

Ainda neste estudo, o perfil bactericida do cinamaldeído também foi observado em isolados de *K. pneumoniae*. Dentre os quatros isolados clínicos testados, três obtiveram CIM de 32 μg/mL, e um isolado obteve CIM de 64 μg/mL. A cepa padrão ATCC 13883 também obteve uma CIM de 32 μg/mL, o que classifica o cinamaldeído com forte atividade antibacteriana frente as cepas de *K. pneumoniae*, conforme os critérios de Morales *et al.* (2008) [15]. Todos os isolados e a cepa padrão tiveram uma CBM de 64 μg/mL, demonstrando também seu efeito bactericida (CBM/CIM ≤ 4) [19, 20] (tabela 2).

Tabela 2. Efeito bactericida do cinamaldeído contra cepas de *K. pneumoniae*.

Cepas	Cinamaldeído			
	CIM	**CBM**	**CBM/CIM**	**Efeito**
***K. pneumoniae* 101**	64	64	1	Bactericida
***K. pneumoniae* 103**	32	64	2	Bactericida
***K. pneumoniae* 104**	32	64	2	Bactericida
***K. pneumoniae* 105**	32	64	2	Bactericida
***K. pneumoniae* ATCC 13883**	32	64	2	Bactericida

CIM e CBM: μg/mL

Hossan *et al.* (2018) [23], analisaram o efeito antibacteriano do cinamaldeído frente a vários microrganismos, dentre eles um isolado clínico de *K. pneumonia*, onde a CIM

desse composto foi de 46,8 μg/mL e a CBM abaixo de 100 μg/mL. Assemelhando-se com os resultados obtidos nesse estudo.

Dessa forma, estes resultados demonstram que o cinamaldeído apresenta potencial antibacteriano contra bactérias Gram positivas e negativas sobre *S. aureus* e *K. pneumoniae*, com maior efeito sobre as cepas Gram negativas. Dessa forma, os diferentes resultados obtidos nesse estudo em comparação aos já publicados na literatura especializada, sugerem as variações intrínsecas de suscetibilidade dos microrganismos. Isso pode ocorrer devido a aquisição ou perda de genes de resistência por exemplo, por meio de mutações ou transferência horizontal desses genes. Além disso, o efeito bactericida do cinamaldeído em bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* e em Gram negativas, como *Escherichia coli*; *Pseudomonas aerugionsa* e *Acinetobacter baumanni*, já foram também descritos na literatura científica, bem como efeitos fungicidas em algumas espécies fúngicas, evidenciando assim seu potencial antimicrobiano, sugerindo ser uma substância promissora para ser explorada na medicina [24-26].

Docking molecular

O docking molecular é uma ferramenta computacional interessante e bastante útil para realizar previsões e simulações em potenciais alvos moleculares e moléculas candidatas a fármacos, ajudando na tomada de decisões, modelagem molecular e estudo do sítio de interação de um ligante para com seu receptor através de funções de pontuação [27].

Os encaixes moleculares foram realizados com a ATP sintase bacteriana, uma enzima vital capaz de sustentar todos os processos metabólicos desses microrganismos. Além disso, a proteína FtsZ parece ser um importante candidato a alvo molecular de interesse farmacológico para terapia antimicrobiana, pois essa molécula é um homólogo procariótico da proteína tubulina eucariótica essencial para o processo de divisão celular [28, 29].

Inicialmente foi realizado o redocking como técnica de validação para o docking subsequente, no qual o cálculo do RMSD é particularmente importante e representativo do *pocket* que será feito o encaixe do cinamaldeído. Dessa forma, observando-se a (tabela 3) e as (figuras 1 e 2) é possível identificar que os RMSDs foram de 1,10 Å para a ATP sintase e 0,51 Å para a FtsZ, em que ambos os valores são ≤ 2,0 Å e a sobreposição dos ligantes cocristalizados com o redocking [17, 18].

Ao analisar o docking molecular, foi observado o acoplamento do cinamaldeído na subunidade B da ATP sintase com liberação de ΔE = -5,10 kcal/mol e fazendo uma ligação hidrofóbica Pi-Alkyl com a ARG-365 e uma ligação de hidrogênio com o aminoácido TYR-150, além de várias outras ligações de van der Waals (figura 3 A e B). Portanto, as energias de ligação são relativamente próximas e o cinamaldeído mesmo

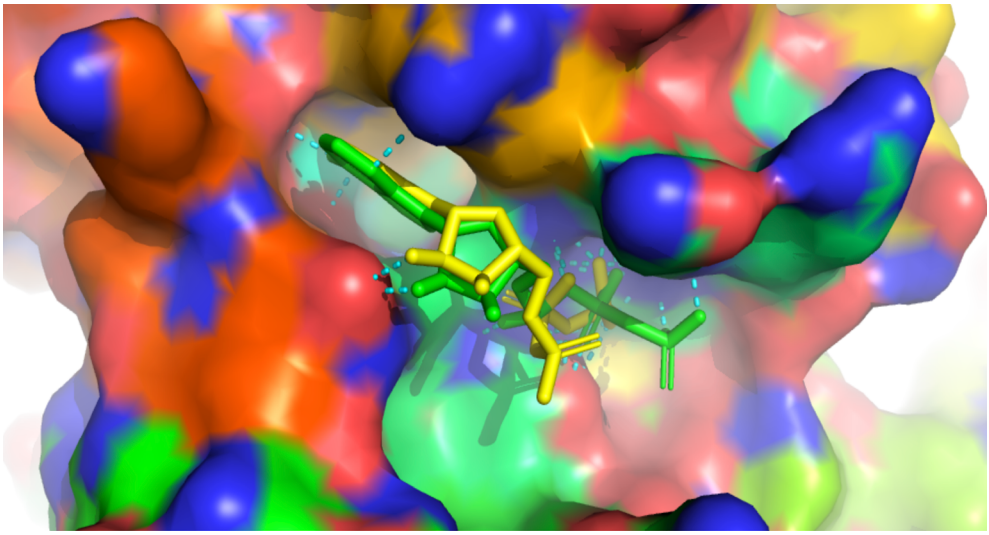


Figura 1. Melhor conformação de redocking e sobreposição de ligantes de ATP na subunidade B da F_1F_O ATP sintase. Verde: cocristal PDB. Amarelo: conformação do ligante após reencaixe. Pontilhado ciano: interações de ligação de hidrogênio.

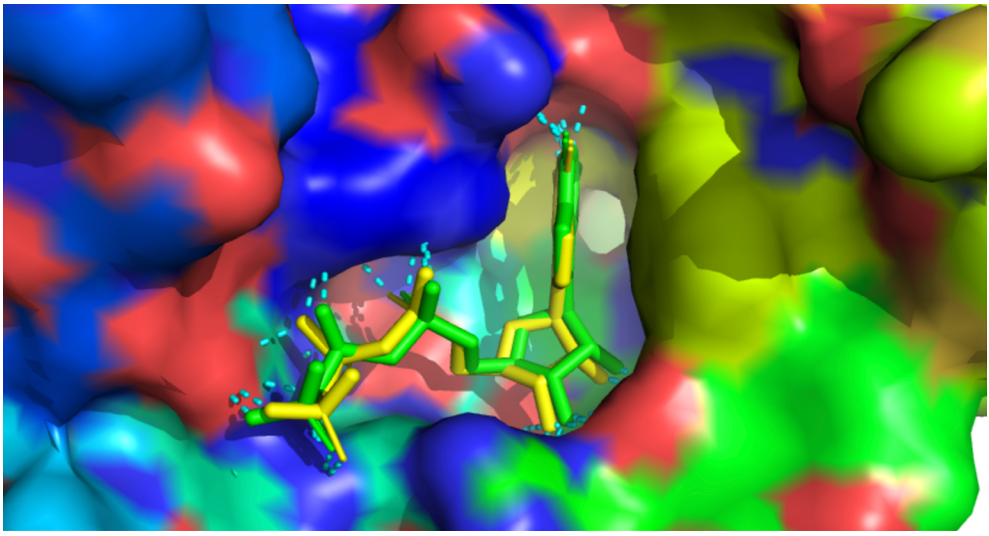


Figura 2. Melhor conformação de redocking e sobreposição de ligantes GTP na proteína FtsZ. Verde: cocristal PDB. Amarelo: conformação do ligante após reencaixe. Pontilhado ciano: interações de ligação de hidrogênio.

Tabela 3. Energias de ligação dos redockings e dockings com o cinamaldeído.

Enzimas	Classificação	Energias de ligação (kcal/mol)	RMSD (Å)	Energias de ligação (kcal/mol)
				Cinamaldeído
ATP sintase (6OQW)	Proteína de membrana	-7,14	1,10	-5,10
FtsZ (5MN5)	Hidrolase	-10,57	0,51	-5,20

sendo uma molécula pequena apresenta potencial para interferir com a síntese de ATP bacteriana, podendo resultar em alterações na conformação da proteína, o que causa a inibição da atividade da ATPase, a inibição de outras enzimas e o crescimento bacteriano alterado [30]. Interessantemente, alguns estudos realizados com *Cronobacter sakazakii*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes* o cinamaldeído tanto em baixas quanto em altas concentrações foi capaz de causar uma ruptura da força motriz dos prótons com rápida depleção de ATP e impediu um aumento na concentração de ATP celular, o que sugere que a inibição da ATPase pode desempenhar um papel significativo na redução da taxa de crescimento e morte microbiana [9, 31, 32].

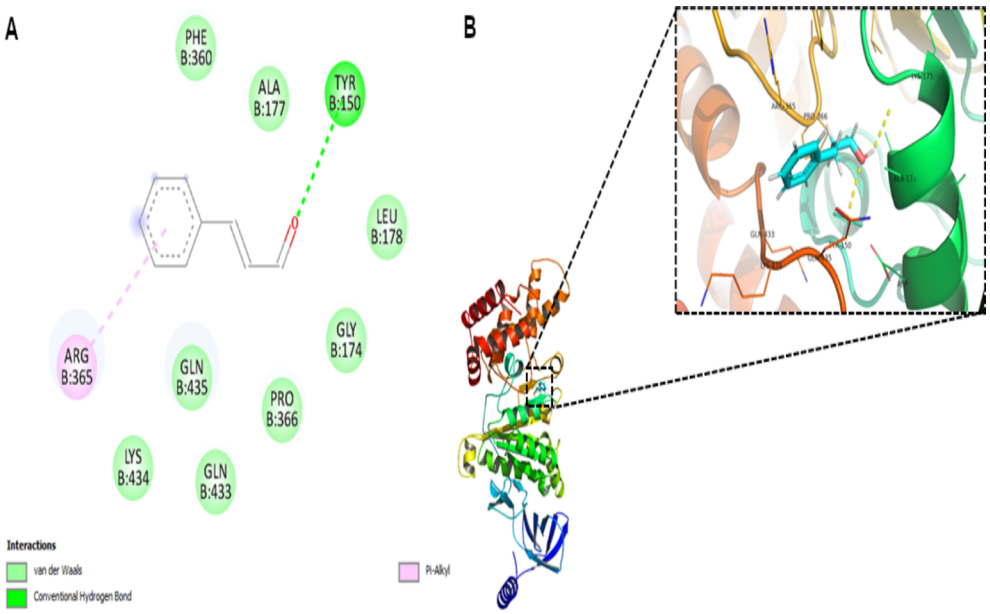


Figura 3. Análise de docking molecular. **A:** Interações bidimensionais. **B:** representação tridimensional das interações do cinamaldeído na subunidade B da ATP sintase. Pontilhado amarelo: interações de ligações de hidrogênio.

A divisão celular bacteriana é regulada pela proteína FtsZ, um homólogo procariótico da tubulina de mamíferos. A polimerização dependente de guanosina trifosfato (GTP) que transforma a FtsZ em filamentos, uma estrutura polimérica altamente dinâmica conhecida como anel Z, que é montada no meio da célula e contrai o envelope celular, separando finalmente a célula mãe em duas células filhas [33]. Dessa forma, observa-se que esse processo é importante para o crescimento bacteriano *in vitro* e *in vivo* e que a proteína FtsZ pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de fármacos com potencial ação antibacteriana.

Portanto, o docking molecular realizado com a proteína FtsZ e o cinamaldeído mostrou que esse composto foi capaz de ligar-se com energia de ΔE = -5,20 kcal/mol e formar ligações Pi-Alkyl com a ALA-186, carbono-hidrogênio coma a MET-105 e pontes de hidrogênio com a ARG-143 e a GLY-107, além de várias interações de van der Waals (Figura 4 A e B). Sendo assim, de maneira preditiva parece que o cinamaldeído é capaz de inibir a polimerização de FtsZ dependente de GTP, diminuir a reação de montagem *in vitro* e o agrupamento de FtsZ, perturbar a morfologia do anel Z *in vivo* e reduzir a frequência de formação do anel Z por unidade de comprimento celular, sobretudo em bactérias Gram negativas como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* entre outras [30, 34].

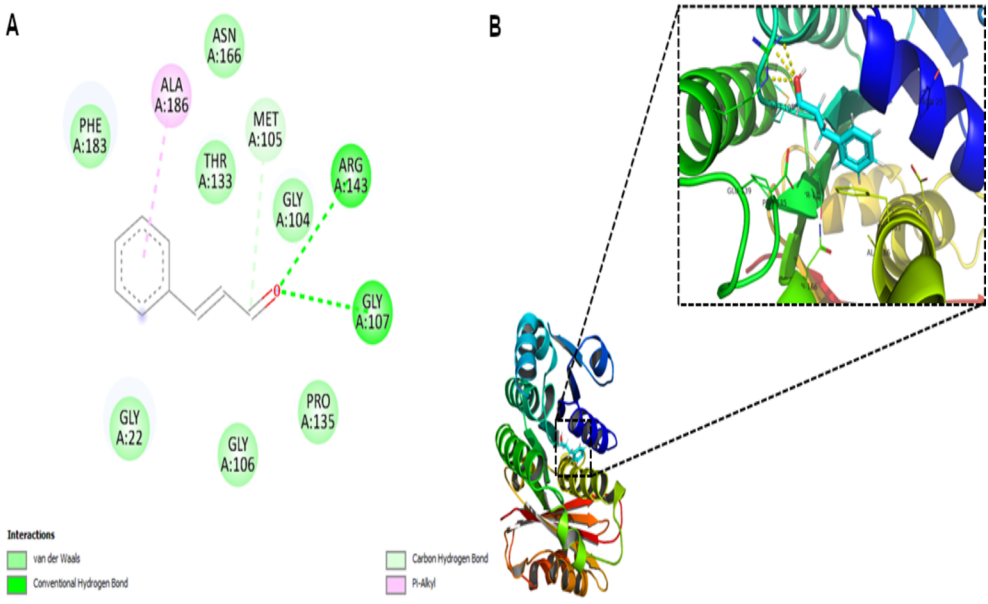


Figura 4. Análise de docking molecular. **A:** Interações bidimensionais. **B:** Representação tridimensional das interações do cinamaldeído no sítio ativo FtsZ. Pontilhado amarelo: interações de ligações de hidrogênio.

Portanto, a FtsZ parece ser um alvo promissor para novas drogas antibacterianas devido à sua especificidade procariótica, sua distância evolutiva da tubulina eucariótica e grande importância na divisão celular bacteriana [35].

Conclusão

A partir dos resultados expostos, pode-se constatar que o cinamaldeído apresenta atividade antibacteriana de caráter bactericida contra bactérias Gram +/-, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Além disso, de maneira preditiva observa-se que o cinamaldeído foi capaz de ligar-se a subunidade B da ATP sintase bacteriana, bem como a FtsZ com energias de ligação semelhantes. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas para obter um melhor entendimento do mecanismo de ação desse composto. Ainda assim, preparações farmacêuticas de cinamaldeído pode vir a ser benéfica para a saúde humana e considerado como agente alternativo para terapia antimicrobiana, aplicações médicas e suplemento antibacteriano em produtos de saúde. Ademais, pode vir a reduzir os custos dos medicamentos, pois o cinamaldeído não apresenta toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade em estudos com mamíferos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

1. S.Y.C Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger, *et al.*, *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clinical Microbiology Reviews*, **28**(3), 603-661 (2015).

2. D.R. Giacobbe, D. Battaglini, E. M. Enrile, *et al.*, Incidence and prognosis of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19: a multicenter study, *Journal of Clinical Medicine*, **10**, 555 (2021).

3. G. Wang, G. Zhao, X. Chao, *et al.*, The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**, 6278 (2020).

4. J. O'Neill, *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*, 2014, 20 p. URL: https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v/items

5. A.H. Holmes, L.S.P. Moore, A. Sundsfjord, *et al.*, Understanding the mechanisms and drives of antimicrobial resistance, *The Lancet*, **387**, 176-187 (2016).

6. C. Lepore, L. Silver, U. Theuretzbacher, *et al.*, The small-molecule antibiotics pipeline, *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 739-740 (2019).

7. P. Tongnuanchan, S. Benjakul, Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation, *Journal of the Food Science***, 79**, 1231-1249 (2014).

8. W. Dhifi, S. Bellili, S. Jazi, *et al.*, Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review, *Medicines* (*Basel*), **3**(4), 25 (2016).

9. A.O. Gill, R.A. Holley, Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5750-5755 (2004).

10. P. Domadia, S. Swarup, A. Bhunia, *et al.*, Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde, *Biochemical Pharmacology*, **75**, 831-840 (2007).

11. J.R. Hood, J.M. Wilkinson, H.M.A. Cavanagh, Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research, *Journal of Essential Oil Research*, **15**, 428-433 (2003).

12. P.F.C. Nascimento, A.C. Nascimento, C.S. Rodrigues, *et al.*, Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **17**, 108-113 (2007).

13. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility, Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Aproved Standard – Ninth Edition, CLSI document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), 2012.

14. F. Hadacke, H. Greger, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, **11**, 137-147 (2000).

15. G. Morales, A. Paredes, P. Sierra, L. Loyola, Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile, *Molecules*, **13**, 790-794 (2008).

16. E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima, *et al.*, Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória

(CMI) de plantas medicinais, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **18**, 301-307 (2008).

17. A.R. Allouche, Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares, *Journal of Computational Chemistry*, **32**, 174-182 (2011).

18. Y. Westermaier, X. Barril, L. Scapozza, Virtual screening: An *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome, Methods, **71**, 44-57 (2015).

19. M.E. Levison, Pharmacodynamics of antimicrobial drugs, *Infectious Diseases Clinics of North America*, **65**, 451-465 (2004).

20. B.T. Thomas, A.J. Adeleke, R.R. Raheem-Ademola, *et al.*, Efficiency of some disinfectants on bacterial wound pathogens, *Life Science Journal*, **9**, 752-755 (2012).

21. T.A. Ferro, J.M. Araújo, B.L. dos Santos Pinto, *et al.*, Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria Mellonella* Model, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 628074 (2021).

22. S. Wang, O.H. Kang, D.Y. Know, Trans-cinnamaldehyde exhibits synergy with conventional antibiotic against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 2752 (2021).

23. M.S. Hossan, H. Jindal, S. Maisha, *et al.*, Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh, *Pharmaceutical Biology*, **56**, 201-208 (2018).

24. M. Elgayyar, F.A. Draughon, D.A. Golden, J.R. Mount, Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, *Journal of food Protection*, **64**, 1019-1024 (2001).

25. Y. Taguchi, Y. Hasumi, S. Abe, Y. Nishiyama, Effect of cinnamaldehyde on hyphal growth and the morphology of *Candida albicans*, *Medical Molecular Morphology*, **46**, 8-13 (2013).

26. M. Albano, F.C.B. Andrade, B.F.M.T. Barbosa, *et al.*, Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **38**, 83-90 (2016).

27. F. Stanzione, I. Giangreco, J.C. Cole, Use of molecular docking computational tools in drug discovery, *Progress in Medicinal Chemistry*, **60**, 273-343 (2021).

28. M. Sobti, J.L. Walshe, D. Wu, *et al.*, Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F_1F_o ATP synthase accommodates symmetry mismatch, *Nature Communications*, **11,** 2615 (2020).

29. J.M. Wagstaff, M. Tsim, M.A. Olivia, *et al.*, A polymerization-associated structural switch in FtsZ that enables treadmilling of model filaments, *mBio*, **8**(3), e00254-17 (2017).

30. F. Nazzaro, F. Fratianni, L. de Martino, *et al.*, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals*, **6**, 1451-1474 (2013).

31. M.A.R. Amalaradjou, K. Venkitanarayanan, Effect of *trans*-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces, *Journal of Food Protection,* **74**, 200-208 (2011).

32. A.O. Gill, R.A. Holley, Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics, *International Journal of Food Microbiology*, **111**, 170-174 (2006).

33. D.P. Haeusser, W. Margolin, Splitsville: Structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring, Nature Reviews Microbiology, **14**, 305-319 (2016).

34. P. Domadia, S. Swarup, A. Bhunia, *et al.*, Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde, Biochemical Pharmacology, **74**, 831-840 (2007).

35. W. Vollmer, The prokaryotic cytoskeleton: A putative target for inhibitors and antibiotics? *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 37-47 (2006).

Como citar este artigo

E.L. Andrade de Oliveira, G. da Silva-Rodrigues, A.A. de Oliveira Filho, C.I. Soares-Medeiros, Atividade anti-*Staphylococcus aureus* e anti-*Klebsiella pneumoniae* do cinamaldeído e suas interações com ATP sintase e FtsZ através do docking molecular, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 499-513 (2023). https://doi.org/10.15446/rccquifa.v52n1.103753

Artículo de investigación científica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109398*

Descripción teórica de la detección electroquímica del fármaco pilocarpina, asistida por el compuesto de colorante escuárico con el oxihidróxido de vanadio (III)

Volodymyr V. Tkach[1,2*], Marta V. Kushnir[1], Sílvio C. de Oliveira[2], Yana G. Ivanushko[3], Tetiana B. Sykyrytska[3], Igor G. Biryuk[3], Olga V. Luganska[4], Vira V. Kopiika[4], Valerii I. Domnich[4], Petro I. Yagodynets´[1], Zholt O. Kormosh[5], Tetiana V. Morozova[6], José I. F. Martins[7], Lucinda Vaz dos Reis[8]

[1] Universidad Nacional de Chernivtsi, 58000, Calle de Kotsyubyns´ky. 2, Chernivtsi, Ucrania.

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

[3] Universidad Estatal de Medicina de Bucovina, 58000, Plaza Teatral. 9, Chernivtsi, Ucrania.

[4] Universidad Nacional de Zaporizhzhia, 69600, Calle de Zhukovsky, 68, Zaporizhzhia, Ucrania.

[5] Universidad Nacional del Este Europeo, 43000, Av. de Libertad, 13, Lutsk, Ucrania.

[6] Universidad Nacional de Transporte y Rodaje, 02000, Calle de Omelianovych-Pavlenko, 1, Kiev, Ucrania.

[7] Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 4200-465, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, Porto, Portugal.

[8] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Folhadela, Vila Real, Portugal.

*Correo electrónico: nightwatcher2401@gmail.com

Recibido: 2 de enero de 2022

Revisado: 23 de febrero de 2023

Aceptado: 26 de enero de 2023

Resumen

Introducción: la pilocarpina es un fármaco de origen natural, un agonista no selectivo de los receptores muscarínicos, usado en el tratamiento de una amplia variedad de estados patológicos oftálmicos. Sin embargo, su acción depende fuertemente de la dosis, por lo que se hace necesario desarrollar un método rápido y exacto para su detección. **Metodología:** se desarrolla y analiza un modelo matemático, que describe el desempeño del cátodo, modificado por el oxihidróxido de vanadio, inmovilizado

sobre un colorante escuárico, en la detección de la pilocarpina. **Resultados:** se describe un proceso catódico, en el que se reduce la policarpina, con la interrupción del anillo lactónico, seguida por la formación del diol correspondiente al ácido 2-etilo-3-((N-metilo)imidazolilmetilo)-4-hidroxibutírico. El análisis del modelo ha confirmado su eficiencia en los procesos electroanalíticos. Por otro lado, el comportamiento oscilatorio en corriente eléctrica también puede ocurrir, aunque se presente más allá del límite de detección. **Conclusiones:** el oxihidróxido de vanadio puede servir de modificador eficaz para la detección electroanalítica de pilocarpina por vía catódica.

Palabras clave: Pilocarpina, oxihidróxido de vanadio, colorantes escuáricos, sensores electroquímicos, estado estacionario estable

Summary

Theoretical description of the electrochemical detection of the drug pilocarpine, assisted by the dye compound squaric with vanadium (III) oxyhydroxide

Introduction: pilocarpine is a drug of natural origin, a non-selective agonist of muscarinic receptors, used in the treatment of a wide variety of ophthalmic pathological states. However, its action strongly depends on the dose, which is why it is necessary to develop a fast and accurate method for its detection. **Methodology:** A mathematical model is developed and analyzed, which describes the performance of the cathode, modified by vanadium oxyhydroxide, immobilized on a squaric dye, in the detection of pilocarpine. **Results:** a cathodic process is described, in which polycarpine is reduced, with the interruption of the lactone ring, followed by the formation of the diol corresponding to 2-ethyl-3-((N-methyl)imidazolylmethyl)-4-hydroxybutyric acid. . Analysis of the model has confirmed its efficiency in electroanalytical processes. On the other hand, oscillatory behavior in electric current can also occur, even if it occurs beyond the detection limit. **Conclusions:** vanadium oxyhydroxide can serve as an effective modifier for the cathodic electroanalytical detection of pilocarpine.

Keywords: Pilocarpine, vanadium oxyhydroxide, squaric dyes, electrochemical sensors, steady state.

Resumo

Descrição teórica da detecção eletroquímica da droga pilocarpina, auxiliada pelo corante composto squaric com oxihidróxido de vanádio (III)

Introdução: a pilocarpina é um fármaco de origem natural, agonista não seletivo dos receptores muscarínicos, utilizado no tratamento de uma ampla variedade de estados patológicos oftálmicos. No entanto, sua ação depende fortemente da dose, por isso é necessário desenvolver um método rápido e preciso para sua detecção. **Metodologia:** é desenvolvido e analisado um modelo matemático que descreve o desempenho do cátodo, modificado por oxihidróxido de vanádio, imobilizado sobre um corante quadrado, na detecção de pilocarpina. **Resultados:** é descrito um processo catódico, no qual a policarpina é reduzida, com a interrupção do anel lactona, seguida da formação do diol correspondente ao ácido 2-etil-3-((N-metil)imidazolilmetil)-4-hidroxibutírico . A análise do modelo confirmou sua eficiência em processos eletroanalíticos. Por outro lado, também pode ocorrer comportamento oscilatório na corrente elétrica, mesmo que ocorra além do limite de detecção. **Conclusões:** oxihidróxido de vanádio pode servir como um modificador eficaz para a detecção eletroanalítica catódica de pilocarpina.

Palavras-chave: Pilocarpina, oxihidróxido de vanádio, corantes quadrados, sensores eletroquímicos, estado estacionário.

Introducción

La pilocarpina, es decir, (3R-4R)-3.etil-4-[(3-metilimidazol-4-il)-metil]oxolan-2ona (masa molar 208,257 g/mol, Número CAS 92-13-7), es un fármaco de origen natural, aislado de arbustos tropicales, pertenecientes al género Pilocarpus [1-4]. Siendo un agonista no selectivo de los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático, él se usa en el tratamiento de la amplia variedad de estados patológicos oftálmicos, incluyendo xeroftalmía, glaucoma crónico de ángulo abierto y el glaucoma agudo de ángulo cerrado.

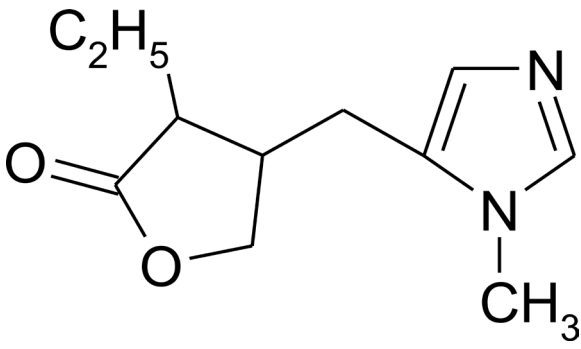


Figura 1. Pilocarpina.

Como la pilocarpina no es una sal cuaternaria, o sea, no contiene carga positiva en el átomo de nitrógeno, la pilocarpina neutra consigue traspasar la barrera hematoencefálica [5-8]. Por la misma razón, ella consigue absorberse fácilmente en las estructuras lipídicas oculares y atravesarlas. Así, la pilocarpina acelera la salida del humor del ojo, debido a la contracción del musculo ciliar y del portero del iris, reduciendo la presión intraocular. Otros usos oftálmicos son la reducción de tamaño de pupilas, para aliviar síntomas post-quirúrgicos como fotofobia.

Otrosí, el medicamento se usa, también para aliviar las síntomas de boca seca (xerostomía), porque su acción acelera la salida no solo de lágrimas, sino de sudor y saliva. También añaden la pilocarpina a la ración de personas, sujetas a exámenes de sudor, que miden la concentración de electrólitos en él, principalmente para diagnosticar la fibrosis quística [9-12].

Por otro lado, su concentración excesiva y su uso duradero pueden causar efectos colaterales como salida demasiada de lágrimas, sudor, saliva y hasta moco bronquial [13-17]. Otros efectos adversos incluyen bradicardia, hipotensión general, malestar o dolor ocular y diarrea. Como la acción del medicamente depende fuertemente de la dosis, se hace necesario desarrollar un método rápido y exacto de la medición de su concentración en varios medios, y esta tarea permanece actual [18-24].

Poseyendo grupos electroactivos (el núcleo imidazólico y fragmento de butirolactona), la pilocarpina se puede detectar por vía electroquímica [25-27]. Aunque los métodos, envolviendo la electrooxidación sean posibles, los catódicos son más preferibles y más fáciles de realizar en práctica.

Una de las sustancias, que pueden ser usadas como modificadoras de cátodo para la detección de la pilocarpina, es el oxihidróxido de vanadio trivalente. Las propiedades

de oxihidróxido de vanadio trivalente son bastante parecidas con las del oxihidróxido de cobalto [28-31], pero con más tendencia de oxidarse.

Para mejorar el desempeño de las nanopartículas del oxihidróxido de vanadio, se prefiere usarlo como parte de un material compuesto, en el que la fase orgánica sería un polímero conductor [32-34] o material afín como colorante escuárico [35-39]. La fase orgánica del material compuesto suele desempeñar dos funciones:

- La estabilizadora de nanopartículas metálicos, cuya ubicación en la matriz orgánica puede ser esencial para el desempeño electroanalítico;
- La mediadora de la transferencia de electrones.

Sin embargo, el uso de nuevos procesos electroanalíticos, antes de ser implementado en práctica, debe ser analizado teóricamente. Con eso se resuelven los problemas como:

- La indecisión acerca del mecanismo más probable de las etapas químicas y electroquímicas, que llevan a la aparición de la señal electroanalítica;
- La indecisión acerca de la secuencia y orden de reacciones, con las que se da el proceso electroanalítico;
- La posibilidad de realización de inestabilidades oscilatoria y monotónica, características para sistemas análogos [40-43].

La resolución de tres problemas mencionados tiene como etapa importante una investigación teórica *a priori* del comportamiento del sistema electroanalítico. Puesto así, en este trabajo se investiga del punto de vista matemático la posibilidad de determinación electroquímica de la pilocarpina en la presencia del oxihidróxido de vanadio, depositado sobre un colorante escuárico. Por el desarrollo del modelo y su análisis se verifican los requisitos de estabilidad de estado estacionario, bien como las condiciones de las inestabilidades oscilatoria y monotónica. Otrosí, mediante el análisis teórico se compara (com exactitud y sin ensayos experimentales adicionales) el comportamiento de este sistema con los semejantes [44-48].

El sistema y su modelo

la pilocarpina se reduce de manera gradual en el medio moderada y fuertemente ácido. Sin embargo, el oxihidróxido de vanadio consigue proveer la reducción del compuesto a valores más próximos del pH neutro.

En la primera etapa, el anillo lactónico se interrumpe, rindiendo un aldehído hidroxibutírico sustituido, cuya reducción en la segunda etapa restaura el diol. En el medio próximo del neutro, en el que el oxihidróxido se oxida hasta el dióxido de vanadio, no se ioniza el nitrógeno piridínico, lo que hace menos dinámico el comportamiento del sistema.

El proceso electroanalítico se realiza según la Fig. 2:

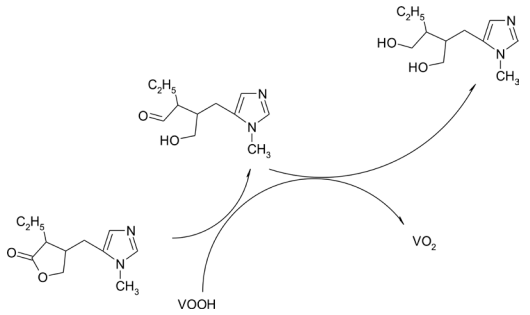


Figura 2. La reducción gradual de la pilocarpina sobre el oxihidróxido de vanadio

Así, para describir el comportamiento del sistema electroanalítico, nosotros introducimos tres variables:

p – la concentración de la pilocarpina en la capa presuperficial;

p^* – la concentración del primer producto de la reducción de la pilocarpina;

v – el grado de recubrimiento del área de la matriz por el dióxido de vanadio.

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

Se puede verificar que el comportamiento del sistema se describe por el conjunto de ecuaciones diferenciales (1):

$$\begin{cases} \dfrac{dp}{dt} = \dfrac{2}{\delta}\left(\dfrac{\Delta}{\delta}(p_0 - p) - r_1\right) \\ \dfrac{dp^*}{dt} = \dfrac{2}{\delta}(r_1 - r_2) \\ \dfrac{dv}{dt} = \dfrac{1}{V}(r_1 + r_2 - r_3) \end{cases} \quad (1)$$

Siendo **Δ** el coeficiente de la difusión, p_0 la concentración de la pilocarpina en el interior de la solución, V es la concentración superficial máxima del dióxido de vanadio y los parámetros r son las velocidades de las respectivas reacciones, que se pueden calcular como:

$$r_1 = k_1 p(1-v)^2 \tag{2}$$

$$r_2 = k_2 p * (1-v)^2 \tag{3}$$

$$r_3 = k_3 v \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \tag{4}$$

En las que los parámetros k son constants de velocidades de las respectivas reacciones, F es el número de Faraday, φ_0 es el salto de potencial en la DCE, relacionado al potencial de carga cero, R es la constante universal de gases y T es la temperatura absoluta.

Relativamente a los sistemas semejantes [45-49], este sistema suele comportarse con mayor simplicidad y menos dinámicamente. Así, se trata de un sistema electroanalítico estable, según se expondrá abajo.

Resultados y discusión

Para investigar el comportamiento del sistema con la detección electroquímica de la pilocarpina, a través de la reducción electroquímica asistida por el oxihidróxido de vanadio, depuesto sobre el colorante escuárico, nosotros analizamos el conjunto de ecuaciones diferenciales (1), mediante la teoría de estabilidad lineal. Los elementos estacionarios de la matriz funcional jacobiana se describen según:

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

Siendo

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

$$a_{12} = 0 \tag{7}$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta}(2k_1 p(1-v)) \tag{8}$$

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

$$a_{22} = \frac{2}{\delta}(-k_2(1-v)^2) \tag{10}$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta}(-2k_1p(1-v) + 2k_2p*(1-v)) \tag{11}$$

$$a_{31} = \frac{1}{V}(k_1(1-v)^2) \tag{12}$$

$$a_{32} = \frac{1}{V}(k_2(1-v)^2) \tag{13}$$

$$a_{33} = \frac{1}{V}\left(-2k_1p(1-v) - 2k_2p*(1-v) - k_3\exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + jk_3v\exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right)\right) \tag{14}$$

Observando los elementos de la diagonal principal de la matriz jacobiana, que son (6), (10) y (14) se puede observar que el comportamiento oscilatorio tiene menor probabilidad de realización, al compararse con los sistemas semejantes [45 – 49], aunque todavía pueda acaecer.

Realmente, sin influencias a la doble capa de las reacciones químicas ni procesos autocatalíticos o superficiales, capaces de influir la fuerza iónica de la capa y conductividad del ánodo, existe solamente una causa del comportamiento oscilatorio – la influencia de la etapa electroquímica. Como se sabe, la inestabilidad oscilatoria vía la bifurcación de Hopf se realiza si en los elementos de la diagonal principal contienen elementos positivos, correspondientes a la positiva conexión de retorno. El único elemento, capaz de ser positivo, en la diagonal principal es el término $jk_3v\exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) > 0$, si j>0, que describe las influencias supracitadas de la etapa electroquímica.

A fin de evaluar la estabilidad de estado estacionario en este sistema, nosotros aplicamos el criterio Routh-Hurwitz al conjunto de ecuaciones diferenciales (1). Para facilitar el análisis del determinante de la matriz jacobiana, evitando la aparición de expresiones grandes, nosotros introducimos nuevas variables, haciendo que el determinante de la matriz se aparezca como (15):

$$\frac{4}{\delta^2 V}\begin{vmatrix} -\kappa - \Xi & 0 & \Sigma \\ \Xi & -\Lambda & T - \Sigma \\ \Xi & \Lambda & -T - \Sigma - \Omega \end{vmatrix} \tag{15}$$

Abriendo los paréntesis rectos y aplicando el requisito Det J<0, saliente del criterio, nosotros obtenemos la condición de estabilidad, descrita como (16):

$$-\kappa(2\Lambda\Sigma + \Lambda\Omega) - \Xi(\Lambda\Sigma + \Lambda\Omega) < 0 \tag{16}$$

Lo que define un sistema electroanalítico eficiente y controlado tanto por la difusión de la pilocarpina, tanto por la cinética del proceso. La condición (16) con certeza se satisface, en el caso de la positividad del parámetro $\Omega = k_3 \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - jk_3 v \exp\left(-\frac{F\varphi_0}{RT}\right)$, que describe la ausencia o fragilidad de las influencias de la doble capa, descritas encima.

Realmente, siendo el parámetro Ω positivo, habiendo vista que los demás parámetros de la inecuación (16) solamente pueden tener valor positivo, nosotros confirmamos que la expresión del lado izquierdo de la inecuación se mueve hacia los valores más negativas. Esto se corresponde a la disminución de las deviaciones de estados estacionarios correspondientes hasta su anulación, lo que hace más estable el estado estacionario.

No habiendo reacciones laterales, capaces de comprometer la estabilidad del analito o modificador, la estabilidad del estado estacionario será correspondiente a la eficiencia electroanalítica del proceso. Así, la dependencia lineal entre el parámetro electroquímico y la concentración se mantendrá en una zona topológica vasta, correspondiente a un diapasón ancho de concentraciones.

Cuando el estado estacionario está en vigor, el determinante tiene valores negativos. Ya cuando el determinante se anula, se obtiene el límite de detección, descrito por la *inestabilidad monotónica.* Su punto sirve de margen entre estados estacionarios estables e inestables y, para el caso, se describe como:

$$-\kappa(2\Lambda\Sigma + \Lambda\Omega) - \Xi(\Lambda\Sigma + \Lambda\Omega) = 0 \tag{17}$$

El mismo modelo podrá describir el comportamiento del sistema, en el que se usaría el vanadio bivalente u otros compuestos metálicos reductores fuertes en medio neutro o ligeramente ácido. Sin embargo, en el medio fuertemente ácido se añade una reacción lateral, que compromete la estabilidad del analito y del modificador. Así, el modelo se transformará en los descritos en [45-49].

Conclusiones

El análisis teórico de la detección electroquímica de pilocarpina sobre el oxihidróxido de vanadio, depuesto sobre una matriz escuárica, dejó concluir que:

- Pese que el mecanismo de la detección del analito sea híbrido, se trata de un sistema electroanalítico eficiente y estable;
- El proceso electroanalítico se controla de igual manera por la difusión o por la reacción;
- El comportamiento oscilatorio en este sistema se hará menos probable que en sistemas semejantes, siendo causado apenas por las influencias de la etapa electroquímica.

Agradecimientos

Volodymyr V. Tkach agradece a la Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto y a la Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro su apoyo en los tiempos difíciles para Ucrania y su ciencia.

Conflicto de intereses

No se declararon conflictos de intereses entre los autores.

Referencias

1. T. Mansoori, Pilocarpime 1.25 % for the treatment of presbyopia, *Indian J. Ophthalmol.*, **71**, 308-309 (2023).
2. L.R. Wiseman, D. Faulds, Oral pilocarpine: A review of its pharmacological properties, *Drugs*, **49**, 143-155 (2012).
3. N. Jain, A. Verma, N. Jain, Formulation and investigation of pilocarpine hydrochloride niosomal gerls for the treatment of glaucoma: Intraocular pressure measurement in white albino rabbits, *Drug Deliv.*, **27**, 888-899 (2020).
4. A. Kapourani, K.N. Kontogiannopoulos, P. Barmpalexis, A review of the role of pilocarpine on the management of xerostomia and the importance of the topical administration systems development, *Pharmaceuticals*, **15**, 762 (2022).
5. N. Tsifetaki, G. Kitsos, C. Paschides, *et al.*, Oral pilocarpine for the treatment of ocular symptoms in patients with Sjogren´s Syndrome. A randomised 12-week controlled study, *Ann. Rheum. Dis.*, **62**, 1204-1207 (2003).

6. K. Senba, T. Miyamoto, H. Eguchi, Y. Mitamura, The efficacy of oral pilocarpine for the treatment of dry eye symptoms in patients with aqueous tear deficiency and evaporative dry eye, *Inv. Ophthalmol. Visual Sci.*, **52**, 3837 (2011).

7. X. Tan, Y. Zeng, Z. Tu, *et al.*, TRPV1 contributes to the neuroprotective effect of dexmedetomidine in pilocarpine-induced status epilepticus juvenile rats, *BioMed Res. Int.*, **2020**, 7623635 (2020).

8. Y. N. Paudel, Y. Kumari, S. Z. Anidin, *et al.*, Pilocarpine induced behavioral and biochemical alterations in chronic seizure-like conditions in adult zebrafish, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2492 (2020).

9. M. Cifuentes, P. Del Barrio-Díaz, C. Vera-Kellet, Pilocarpine and artificial saliva for the treatment of xerostomia and xerophthalmia in Sjogren Syndrome: A double-blind randomized controlled trial, *Br. J. Dermatol.*, **179**(5), 1056-1061 (2018).

10. M. Watanabe, Ch. Yamada, Y. Komagata, *et al.*, New low-dose liquid pilocarpine formulation for treating dry mouth in Sjogren Syndrome: Clinical efficacy, symptom relief and improvement in quality of life, *J. Pharm. Health Care Sci.*, **4**, 4 (2018).

11. C. Y. Hsu, K.-Ch. Hung, M. Lin, *et al.*, The effect of pilocarpine on dental caries in patients with primary Sjogren´s Syndrome: a database prospective cohort study, *Arthritis Res. Ther.*, **21**, 251 (2019).

12. C-Q. Cheng, H., Xu, L. Liu, *et al.*, Efficacy and safety of pilocarpine for radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis, *J. Amer. Dent. Assoc.*, **147**(4), 236-246 (2016).

13. A.M. Farag, C. Holliday, J. Cimmino, *et al.*, Comparing the effectiveness and adverse effects of pilocarpine and cevimeline in patients with hyposalivation, *Oral Dis.*, **25**, 1937-1944 (2019).

14. N. Nakamura, N. Sasano, H. Yamashita, *et al.*, Oral pilocarpine (5 mg t.i.d.) used for xerostomia causes adverse effects in Japanese, *Auris Nasus Larinx*, **36**, 310-313 (2009).

15. B. Motamed, A. Alaee, A. Azizi, *et al.*, Comparison of the 1% and 2% pilocarpine mouthwash in a xerostomic population: A randomized clinical trial, *BMC Oral Health*, **22**, 548 (2022).

16. E.B. Silberstein, Reducing the incidence of 131I-induced sialadenitis: The role of pilocarpine, *J. Nucl. Med.*, **49**, 546-549 (2008).

17. P.L. Dodi, Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: Current perspectives on management, *Vet. Med. Res. Rep.*, **6**, 341 (2015).

18. S. Felberg, P.E. Correa-Dantas, E.H. Sato, Oral pilocarpine for the treatment of dry eye in patients with Sjogren´s Syndrome, *Arq. Bras. Oftalmol.*, **85**, 269-276 (2022).

19. P.Y. Yu, G. Tang, H. Cheng, *et al.*, Determination of pilocarpine in human plasma by LC–APCI–MS–MS and application to a pharmacokinetic study, *Chromatography*, **74**, 921-929 (2011).

20. R. Mendes de Freitas, F. de Oliveira-Silva, M. Goretti de Vasconcelos-Silva, D. Feng, Antioxidant mechanisms of iso-6-cassine in suppressing seizures induced by pilocarpine, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **21**, 437-443 (2011).

21. A.M. Abbass, Preparation of pilocarpine hydrochloride selective electrodes, *J. Al-Nahrain Univ.*, **20**, 13-19 (2017).

22. S. McGee, G.O. Waring, Pilocarpine hydrochloride ophthalmic solution 1,25%: An innovative prescription eye drop for the treatment of presbyopia, *TouchReviews in Ophthalmology*, **16**, 54-62 (2022).

23. M.A. Jackson, J. Giyanani, Y. Shabaik, *et al.*, *In vitro* and in-eye comparison of commercial pilocarpine ophthalmic solution and an optimized, reformulated pilocarpine for presbyopia treatment, *Ophthalm. Ther.*, **11**, 869-879 (2022).

24. R.L. Kow, K. Jiang, A.V. Naydenov, *et al.*, Modulation of pilocarpine-induced seizures by cannabinoid receptor 1, *PLoS One*, **9**, e95922 (2014).

25. W.K. Abdulsahib, S.H. Kathem, M.Y. Al-Radeef, L.S. Jasim, *Mentha piperita* oil exerts an antiepileptic effect in pilocarpine and pentylenetetrazol-induced seizures in mice, *Veterin. Med. Int.*, **2022**, 4431317 (2022).

26. Ch. Fan, G. Liu Y. Long, *et al.*, Thiolation in arsenic metabolism: A chemical perspective, *Metallomics*, **10**, 1368-1382 (2018).

27. X-L. Liu, A novel sensor based on electropolymerizationpoly(safranin) film electrode for voltammetric determination of 4-nitrophenol, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **31**, 1182-1186 (2010).

28. 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**, 122-128 (2015).

29. 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**, 318-326 (2015).

30. O. Stadnik, Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt, Diss. Kand. Chim. N. – Kyiv., 2011.

31. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting, Abstract # 2240.

32. 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).

33. S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Saboraud, The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 283-293 (2000).

34. F. Ağın, Electrochemical determination of amoxicillin on a poly(acridine orange) modified glassy carbon electrode, *Anal. Lett.*, **49**, 1366-1378 (2016).

35. E. Lima, L. Reis, "Lights, Squaraines, Action!" - The role of squaraine dyes in photodynamic therapy, *Future Med. Chem.*, **19**, 1385-1402 (2022).

36. T.D. Martins, E. Lima, R.E. Boto, *et al.*, Red and near-infrared absorbing dicyanomethylene squaraine cyanine dyes: Photophysicochemical properties and anti-tumor photosensitizing effects, *Materials*, **13**, 2083 (2020).

37. S. Sreejith, P. Carol, P. Chithra, A. Ajayaghosh, Squaraine dyes: A mine of molecular materials, *J. Mater. Chem.*, **18**, 264-274 (2008).

38. D. Lynch, Pyrrolyl-squaraines. Fifty golden years, *Metals*, **5**, 1349-1370 (2015).

39. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *J. Phys. Chem. B*, **114**(40), 12888-12896 (2010).

40. M.S. Ba-Shammakh, Ph. D. thesis, King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dharan, Saudi Arabia, 2002.

41. I. Das, N. Goel, S.K. Gupta, N.R. Agrawal, Electropolymerization of pyrrole: Dendrimers, nano-sized patterns and oscillations in potential in presence of aromatic and aliphatic surfactants, *J. Electroanal. Chem.*, **670**, 1-10 (2012).

42. 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. Metals*, **130**, 73-83 (2002).

43. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene) films, *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 280-285 (2004).

44. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, *et al.*, The mathematical description for sucralose electrochemical detection on the novel acridinic derivative, *Applied Journal of Environmental Engineering Science*, **4**, 141-148 (2018).

45. V.V. Tkach, N.M. Storoshchuk, B.D. Storoshchuk, *et al.*, The theoretical description for sucralose cathodical electrochemical determination on the conducting polymer containing pyridinic nitrogen atoms, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **12**, 1499-1506 (2022).

46. V.V. Tkach, M.V; Kushnir, S.C. de Oliveira, *et al.*, The theoretical description for a sucralose electrochemical cathodical determination over a 9-9′-diacridyl-modified electrode, *Orbital*, **13**, 219- 222 (2021).

47. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, *et al.*, Theoretical description for anti-COVID-19 drug molnupiravir electrochemical determination over the poly(1,2,4-triazole)-co-squaraine dye composite with cobalt (III) oxyhydroxide, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **13**, 74 (2023).

48. V.V. Tkach, M.M. Kucher, N.Slyvka, *et al.*, The modeling for anti-Covid-19 drug molnupiravir electrochemical sensing on C_3N_4, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **13**, 446 (2023).

Cómo citar este artículo

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, Y.G. Ivanushko, T.B. Sykyrytska, I.G. Biryuk, O.V. Luganska, V.V. Kopiika, V.I. Domnich, P.I. Yagodynets′, Z.O. Kormosh, T.V. Morozova, J.I.F. Martins, L. Vaz dos Reis, Descripción teórica de la detección electroquímica del fármaco pilocarpina, asistida por el compuesto de colorante escuárico con el oxihidróxido de vanadio (III), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 511-524 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109398

Artigo de pesquisa cientifica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109399*

A descrição matemática da detecção eletroanalítica da metaqualona, baseada na sua eletrooxidação sobre o compósito da poli(5-amino-1,4-naftoquinona) com o oxihidróxido de cobalto

Volodymyr V. Tkach[1,2*], Marta V. Kushnir[1], Sílvio C. de Oliveira[2], Adriano O. da Silva[3], Yana G. Ivanushko[4], Bohdana Yu. Banul[4], Tetiana V. Honchar[4], Petro I. Yagodynets´[1], Olga V. Luganska[5], Zholt O. Kormosh[6], José I. F. Martins[7], Vira M. Odyntsova[8], Mykola P. Krasko[8], Necdet Karakoyun[9]

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

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

[3] Universidade Federal do Oeste do Pará, Campus Juruti, 68170 – 000, Rua Veríssimo de Souza Andrade, s/n, Juruti, PA, Brasil.

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

[5] Universidade Nacional de Zaporizhzhya, Faculdade de Biologia, 69095, Rua de Zhukovs'ky, 66, Zaporizhzhya, Ucrânia.

[6] Universidade Nacional de Volyn, Lutsk, Ucrânia, 43000, Av. da Liberdade, 13, Luts'k, Ucrânia.

[7] Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 4200-465, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, Porto, Portugal.

[8] Universidade Estatal de Medicina de Zaporizhzhia, 69600, Av. de Mayakovsky, 24, Zaporizhzhia, Ucrânia.

[9] Universidade Yüzüncü Yil de Vã, 65090, Bardakçi, Vã, Turquia.

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

Recebido: 19 de fevereiro de 2022

Revisado: 23 de fevereiro de 2023

Aceto: 26 de fevereiro de 2023

Resumo

Introdução: metaqualona é um fármaco calmante, geralmente usado para substituir barbituratos, já que não possui efeitos colaterais, que eles provocam, causando, entretanto, os seus próprios – e bastante significativos. A sua realização depende fortemente da dose aplicada, razão por que a medição da sua concentração é atual. **Metodologia:** pela primeira vez, o comportamento do sistema com a determinação eletroanalítica da metaqualona em meio básico sobre o elétrodo, modificado pelo compósito da poli(5-amino-1,4-naftoquinona) com o oxihidróxido de cobalto, tem sido descrito teoricamente. O modelo matemático correspondente foi desenvolvido e analisado mediante a teoria de estabilidade lineal e análise de bifurcações. **Resultados:** como a função iônica do produto de reação se opõe à função iônica do reagente, o comportamento oscilatório aumentará a sua probabilidade de realização, haja vista as mudanças bruscas na estrutura e força iônica da dupla camada eléctrica (DCE). Não obstante, o compósito poli(5-amino-1,4-naftoquinona)/CoO(OH) é um modificador eficiente para a detecção da metaqualona, o que se pode mostrar com o modelo. **Conclusão:** o compósito poli(5-amino-1,4-naftoquinona)/CoO(OH) pode ser um modificador eficaz para a detecção electroquímica da metaqualona em meio básico.

Palavras-chave: Metaqualona, sensor eletroquímico, polímeros condutores, poli(-5-amino-1,4-naftoquinona), oxihidróxido de cobalto, oscilações eletroquímicas, estado estacionário estável.

Summary

The mathematical description of the electroanalytical detection of methaqualone, based on its electrooxidation on the composite of poly(5-amino-1,4-naphthoquinone) with cobalt oxyhydroxide

Introduction: methaqualone is a calming drug, generally used to replace barbiturates, since it does not have side effects, which they cause, causing, however, their own – and quite significant ones. Its performance strongly depends on the applied dose, which is why the measurement of its concentration is current. **Methodology:** for the first time, the behavior of the system with the electroanalytical determination of methaqualone in basic medium on the electrode, modified by the composite of poly(5-amino-1,4-naphthoquinone) with cobalt oxyhydroxide, has been theoretically described. The corresponding mathematical model was developed and analyzed

using linear stability theory and bifurcation analysis. **Results:** as the ionic function of the reaction product is opposed to the ionic function of the reactant, the oscillatory behavior will increase its probability of realization, given the sudden changes in the structure and ionic strength of the electrical double layer (ECD). Nevertheless, the poly(5-amino-1,4-naphthoquinone)/CoO(OH) composite is an efficient modifier for methaqualone detection, which can be shown with the model. **Conclusion:** the poly(5-amino-1,4-naphthoquinone)/CoO(OH) composite can be an effective modifier for the electrochemical detection of methaqualone in basic medium.

Keywords: Methaqualone, electrochemical sensor, conductive polymers, poly(5-amino-1,4-naphthoquinone), cobalt oxyhydroxide, electrochemical oscillations, stable steady state.

Resumen

Descripción matemática de la detección electroanalítica de metacualona, basada en su electrooxidación en el compuesto de poli(5-amino-1,4-naftoquinona) con oxihidróxido de cobalto

Introducción: la metacualona es una droga calmante, generalmente utilizada en reemplazo de los barbitúricos, ya que no tiene los efectos secundarios que éstos provocan, provocando, sin embargo, los suyos propios y bastante significativos. Su rendimiento depende fuertemente de la dosis aplicada, por lo que la medida de su concentración es actual. **Metodología:** por primera vez se ha descrito teóricamente el comportamiento del sistema con la determinación electroanalítica de metacualona en medio básico sobre el electrodo, modificado por el composite de poli(5-amino-1,4-naftoquinona) con oxihidróxido de cobalto. . El modelo matemático correspondiente se desarrolló y analizó utilizando la teoría de la estabilidad lineal y el análisis de bifurcación. **Resultados:** como la función iónica del producto de reacción se opone a la función iónica del reactivo, el comportamiento oscilatorio aumentará su probabilidad de realización, dados los cambios repentinos en la estructura y fuerza iónica de la doble capa eléctrica (ECD). Sin embargo, el compuesto de poli(5-amino-1,4-naftoquinona)/CoO(OH) es un modificador eficaz para la detección de metacualona, lo que se puede demostrar con el modelo. **Conclusión:** el compuesto poli(5-amino-1,4-naftoquinona)/CoO(OH) puede ser un modificador efectivo para la detección electroquímica de metacualona en medio básico.

Palabras clave: Metacualona, sensor electroquímico, polímeros conductores, poli(5-amino-1,4-naftoquinona), oxihidróxido de cobalto, oscilaciones electroquímicas, estado estacionario estable.

Introdução

metaqualona (Fig. 1), ou seja, 2-metil-3-o-tolil-4(3H)-quinazolona (massa molar 250, 3 g/mol, número CAS 72-44-6) é um fármaco sedativo e hipnótico [1-4], frequentemente usado em pílulas para dormir como substituinte de barbituratos, já que não tinha efeitos colaterais, característicos para estes. Ela ainda pode ser aplicada nos EUA, em Portugal e no Brasil, não só como sedativo, mas também para lenir dores moderadas e fortes [5, 6]

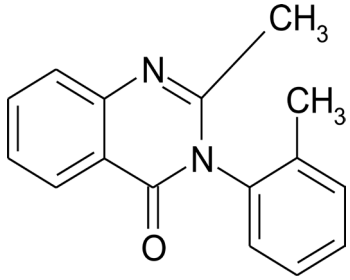


Figura 1. Metaqualona.

Embora a metaqualona ainda se possa usar amplamente em países mencionados, os seus efeitos colaterais [7-10] fazem com que ela seja proibida em alguns países do Leste Europeu. Estes efeitos colaterais são delírio, convulsões, hipertonia, hiperreflexia, vómito, falha renal, parada cardíaca e respiratória. Outrossim, a dose de 8 gramas é considerada letal, e o uso excessivo do fármaco ou o seu uso acompanhado à intoxicação alcoólica, pode levar ao coma. Destarte, o desenvolvimento dos métodos da análise da metaqualona é uma tarefa realmente atual [11-15], e os métodos eletroanalíticos dar-lhe-iam uma solução interessante.

Possuindo grupos, capazes de oxidar e reduzir, a metaqualona pode ser facilmente detectada por médio eletroquímico [16-18]. Ao ser usado um oxidante bastante forte, como o oxihidróxido de cobalto, pareado com o dióxido de cobalto em meio alcalino, o átomo de nitrogénio piridínico tende a ser N-oxidado, assim como os grupos metilo. Assim, o nitrogénio tornar-se-á menos básico, e os grupos metila oxidar-se-ão até os carboxílicos. Destarte, a função iónica do produto em relação ao próprio fármaco será alterada, o que poderá causar instabilidades electroquímicas, já características para este tipo de processos eletroanalíticos [19-24].

Assim, o objetivo geral deste trabalho é a descrição teórica do sistema com a eletrooxidação de metaqualona sobre um elétrodo, modificado pelo compósito de poli(5-amino-1,4-naftoquinona) com o oxihidróxido de cobalto. Para a sua resolução, nós alcançamos objetivos específicos:

- Propor o mecanismo mais provável da realização do processo;
- Desenvolver o modelo, correspondente ao mecanismo;
- Analisado o modelo, derivar as condições de estabilidade do estado estacionário, bem como das instabilidades oscilatória e monotônica;
- Fazer conclusões acerca da eficiência eletroanalítica do processo e comparar o comportamento do sistema com o dos semelhantes [25-28].

O sistema e o modelo

No caso da oxidação da metaqualona, o oxihidróxido de cobalto age como redutor e, na etapa eletroquímica, se oxida, para formar o dióxido, que, por sua vez, é um oxidante bastante poderoso. Ele, por sua vez, oxida os grupos metila para os grupos carboxílicos, que, em meio básico, transformam-se em sais. Esquematicamente, o processo da oxidação será descrito conforme na Fig. 2:

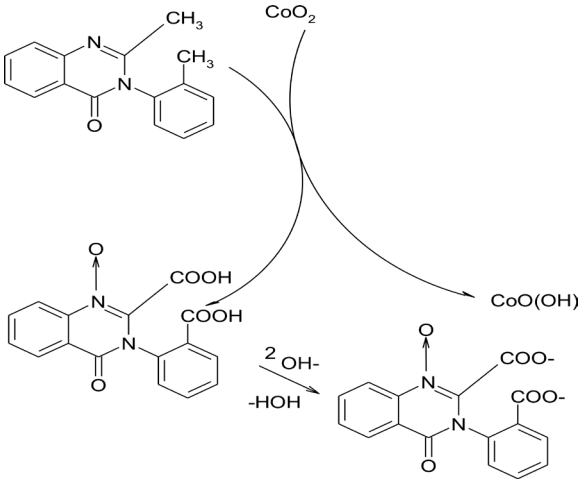


Figura 2. Esquema do processo eletroanalítico.

Haja vista que a etapa eletroquímica se realiza mediante a oxidação na presença da hidroxila (1):

$$CoO(OH) + OH^- - e^- \rightarrow CoO_2 + H_2O \quad (1)$$

para descrever o comportamento deste sistema eletroanalítico, ser-nos-á necessário introduzir três variáveis:

m – a concentração da metaqualona na camada pré-superficial;

a – a concentração da base na camada pré-superficial;

c – o grau de recobrimento da superfície de eléctrodo pelo dióxido de cobalto.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja sob agitação intensa (destarte, podemos menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (destarte, podemos menosprezar o fluxo de migração). Outrossim, supomos que o perfil concentracional das substâncias na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ.

Diante do exposto, o comportamento do sistema será descrito por um conjunto de equações diferenciais (2), conforme:

$$\begin{cases} \frac{dm}{dt} = \frac{2}{\delta}\left(\frac{\Delta}{\delta}(m_0 - m) - r_2\right) \\ \frac{da}{dt} = \frac{2}{\delta}\left(\frac{A}{\delta}(a_0 - a) - r_2 - r_1\right) \\ \frac{dc}{dt} = \frac{1}{C}(r_1 - r_2) \end{cases} \quad (2)$$

Aqui, m_0 e a_0 são concentrações da metaqualona e da base no interior da solução, A e Δ são coeficientes de difusão, C é a concentração superficial máxima do dióxido de cobalto, e os parâmetros r são as velocidades das etapas química e eletroquímica, que se podem calcular conforme (3 – 4):

$$r_2 = k_2 m c^6 a^2 \exp(-lma) \qquad r_1 = k_1(1-c)a \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (3-4)$$

Aqui, os parâmetros k são as constantes de velocidades das respectivas reações, l é o parâmetro, que relaciona a composição e a força iônica da dupla camada elétrica (DCE), F é o número de Faraday, j_0 é salto do potencial, relacionado ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases, e T, a temperatura absoluta.

Como se vê, neste sistema, a influência na condutividade e na força iônica dá-se não só pela etapa eletroquímica, mas também pela química. Outrossim, não só a concentração do próprio fármaco, mas também da base (e, consequentemente o pH) terá o seu impacto na estabilidade do sistema. Apesar disso, o compósito de oxihidróxido

de cobalto com a poli(5-amino-1,4-naftoquinona) pode ser um modificador eficiente para a detecção da metaqualona, conforme descrito abaixo.

Resultados e discussão

Para investigar o comportamento do sistema com a detecção eletroanalítica da metaqualona, assistida pelo compósito CoO(OH) – Poli(5-hidroxi-1,4-naftoquinona), analisamos o conjunto de equações diferenciais de balanço (2), mediante a teoria de estabilidade linear. Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi podem ser calculados como:

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

sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta}\left(-\frac{A}{\delta} - k_2 c^6 a^2 \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lma)\right) \quad (6)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta}(-2k_2 c^6 a \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lma)) \quad (7)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta}(-6k_2 mc^5 a^2 \exp(-lma)) \quad (8)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta}(-k_2 c^6 a^2 \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lca)) \quad (9)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta}\left(-\frac{A}{\delta} - 2k_2 c^6 a \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lma) - k_1(1-c)\exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right)\right) \quad (10)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta}\left(-6k_2 mc^5 a^2 \exp(-lma) + k_1 a \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - jk_1(1-c)a \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right)\right) \quad (11)$$

$$a_{31} = \frac{1}{C}(-k_2 c^6 a^2 \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lma)) \quad (12)$$

$$a_{32} = \frac{1}{C}\left(-2k_2 c^6 a \exp(-lma) + lk_2 mc^6 a^2 \exp(-lma) + k_1(1-c)\exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right)\right) \quad (13)$$

$$a_{33} = \frac{1}{C}\left(-6k_2mc^5a^2\exp(-lma) - k_1a\exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) + jk_1(1-c)a\exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right)\right) \quad (14)$$

Observando os elementos da diagonal principal do jacobiano (6), (10) e (14), pode-se ver que a diagonal principal contém três elementos, capazes de serem positivos. Estes elementos descrevem a positiva conexão de retorno e, por conseguinte, a possibilidade da realização do *comportamento oscilatório*.

Além do elemento $jk_1(1-c)a\exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) > 0$, se j>0, que descreve as influências da etapa eletroquímica na DCE, características para os sistemas semelhantes [21-28], os dois elementos $lk_2mc^6a^2\exp(-lma) > 0$ e $lk_2mc^6a^2\exp(-lma) > 0$ e , que descrevem as influências da etapa química das concentrações tanto da metaqualona, como da base. Destarte, o comportamento oscilatório é mais provável que nos casos mais simples.

Vale a pena mencionar que a concentração da base está presente visivelmente em todos os elementos, que descrevem o comportamento oscilatório. Ou seja, a amplitude e frequência das oscilações far-se-ão dependentes do pH – quanto maior o valor, tanto menor a amplitude e maior a frequência das oscilações.

Quanto à *estabilidade do estado estacionário,* esta se define pelo critério Routh-Hurwitz. Evitando as expressões grandes, nós introduzimos novas variáveis, de modo que o determinante da matriz se descreve como (15):

$$\frac{4}{\delta^2 C}\begin{vmatrix} -\kappa_1 - \Xi & -\Sigma & -P \\ -\Xi & -\kappa_2 - \Sigma - \Lambda & E - P \\ -\Xi & \Lambda - \Sigma & -P - E \end{vmatrix} \quad (15)$$

Abrindo os parênteses retos e aplicando a condição Det J<0, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário, exposto sob a forma de (16):

$$-\kappa_1(\kappa_2 P + \Lambda P + \kappa_2 E + \Sigma E + \Lambda P + \Sigma E) - \Xi(\kappa_2 P - \Lambda P + \kappa_2 E + \Lambda P - \Sigma E) < 0 \quad (16)$$

O que define um processo eletroanalítico eficiente, controlado tanto pela difusão, como pela cinética das reações. A região topológica, correspondente à estabilidade de estado estacionário far-se-á mais estreita que no caso mais simples [25 – 28], haja vista as influências mais expressas de ambas as reações sobre a dupla camada. No entretanto, esta região permanecerá vasta e, com o aumento de pH, até certo ponto, far-se-á ainda mais vasta. Assim, o aumento da concentração do álcali aumenta a eficiência de sensor da metaqualona.

A eficiência eletroanalítica deste sistema manter-se-á, ao serem tomadas as medidas de precaução, que se descreverão brevemente abaixo.

Os requisitos concernentes ao limite de detecção dão-se mediante a *instabilidade monotônica*. O seu ponto separa os estados estacionários estáveis e instáveis, e a sua condição se descreve conforme (17):

$$-\kappa_1(\kappa_2 P + \Lambda P + \kappa_2 E + \Sigma E + \Lambda P + \Sigma E) - \Xi(\kappa_2 P - \Lambda P + \kappa_2 E + \Lambda P - \Sigma E) = 0 \qquad (17)$$

O presente modelo é valido para os valores de pH baixo médio e alto, mas não superior a 12,5. Neste caso, a oxidação de CoO(OH) far-se-á concorrente com a dissolução do oxihidróxido (18):

$$CoO(OH) + 3OH^- + H_2O \rightarrow [Co(OH)_6]^{3-} \qquad (18)$$

A dissolução do oxihidróxido de cobalto far-se-á sentir por meio das instabilidades superficiais e insuficiência eletroanalítica. Como no caso da metaqualona o polímero condutor não poderá assumir as funções de substância ativa na eletroanálise, realizar-se-á a perda de funções eletroanalíticas, que só se poderá recuperar mediante a deposição de nova camada do oxihidróxido de cobalto sobre o polímero. Este caso será descrito num dos nossos próximos trabalhos.

Conclusões

Da análise do sistema com a detecção eletroquímica da metaqualona foi possível concluir que:

- O comportamento eletroquímico deste sistema é altamente dependente do pH. Já o processo eletroanalítico far-se-á eficiente em meios leve, moderada e altamente (até certo ponto) básico;
- O processo é controlado tanto pela difusão (do analito e do álcali), como pela cinética das etapas química e eletroquímica;
- O comportamento oscilatório é mais provável que no caso mais simples, haja vista as influências da etapa química na força iônica da dupla camada.

Agradecimentos

Volodymyr V. Tkach agradece à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro o seu apoio nos tempos difíceis para a Ucrânia e a sua ciência.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

1. M. Puckey, *Quaaludes*, Drugs. URL: https://www.drugs.com/illicit/quaaludes.html, acesso aos 23 de fevereiro de 2023

2. E.F. van Zyl, A survey of reported synthesis of methaqualone and some positional and structural isomers, *Forensic Sci. Int.*, **122**(2-3), 142-149 (2001).

3. J.B. Peng, H.Q. Geng, W. Wang, *et al.*, Palladium-catalyzed four-component carbonylative synthesis of 2,3-disubstituted quinazolin-4(3H)-ones: Convenient methaqualone preparation, *J. Catalysis*, **365**, 10-13 (2018).

4. M.C. Gerald, P.M. Schwirian, Nonmedical use of methaqualone, *Arch. Gen. Psychiatry*, **28**, 627-631 (1973).

5. Recommended methods for the identification and analysis of methaqualone/mecloqualone, for use by national drug analysis laboratories, United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section, Vienna, 2010, 30 p. URL: https://www.unodc.org/documents/scientific/Methaqualone_ST_NAR_15_Rev1.pdf, acesso aos 23 de fevereiro de 2023

6. A.A. Grové, *The forensic analysis of illicit methaqualone-containing preparations by gas chromatography mass spectrometry*, M.Sc. Thesis, University of Pretoria, 2005.

7. S. Tenhouten, Family environment: Implications for sexual dysfunction and methaqualone dependence, *J. Psychoactive Drugs*, **18**, 73-75 (1986).

8. H. Yang, Y. Wang, J. Liu, *et al.*, The next addiction-causing drug class 4-quinazolinone derivatives: Analysis of methaqualone analogs including recently discovered 2-methoxyqualone by different modes of mass spectrometry, *Forensic Toxicol.*, **41**, 59-70 (2023).

9. H. Yang, Sh. Wang, H. Qi, *et al.*, 2-Methoxyqualone, a new recreational drug, discovered from a package seized by the police: A preliminary report, *Forensic Toxicol.,* **40**, 414-416 (2022).

10. I. Ahmad, R. Pawara, H. Patel, *In silico* toxicity investigation of methaqualone´s conjunctival, retinal and gastrointestinal hemorrhage by molecular modeling approach, *Mol. Simul.*, **48**, 1639-1649 (2022).

11. A. Cruz, A. Bermejo, M. López-Rivadulla, P. Fernández, Simultaneous determination of methaqualone and diazepam in plasma by derivative spectroscopy, *Anal. Lett.*, **25**, 253-268 (1992).

12. R. Eker, S. Yilmaz, S. Yağmur, *et al.*, Voltammetric determination of clozapine from its drug form, *J. Sci. Perspect.*, **1**(2), 19-30 (2017).

13. J.A. Inger, E.R. Mihan, J. U. Kolli, *et al.*, DARK classics in chemical neuroscience: Methaqualone, *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 340-350 (2023).

14. I. Ahmad, S. R. Akand, M. Shaikh, *et al.*, Synthesis, molecular modeling study of the methaqualone analogues as anti-convulsant agent with improved cognition activity and minimized neurotoxicity, *J. Mol. Struct.*, **1251**, 131972 (2022).

15. N. German, A. Popov, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Enzymatic formation of polyaniline, polypyrrole, and polythiophene nanoparticles with embedded glucose oxidase, *Nanomaterials* (*Basel*), **9**(5), 806 (2019).

16. Z. Liu, F. Liung, N. Zhang, Y. Liu, Preparation of manganese dioxide/polypyrrole composite by W/O miniemulsion and its electrochemical performance, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **13**, 6584-6597 (2018).

17. H. Wang, N. Ma, Zh. Yan, *et al.*, Cobalt/polypyrrole nanocomposites with controllable electromagnetic properties, *Nanoscale*, **7**, 7189-7196 (2015).

18. M. Ghanbari, F. Shahdost-Fard, M. Rostami, *et al.*, Electrochemical determination of the antipsychotic medication clozapine by a carbon paste electrode modified with a nanostructure prepared from titania nanoparticles and copper oxide, *Microchim. Acta*, **186**, 698 (2019).

19. M.S. Burke, M.G. Kast, L. Trotochaud, *et al.*, Cobalt-iron (oxy)hydroxide oxygen evolution electrocatalysts: the role of structure and composition on activity, stability, and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **137(10)**, 3638-3648 (2015).

20. C. J. Raj, B. Ch. Kim, W. J. Cho, *et al.*, Rapid hydrothermal synthesis of cobalt oxyhydroxide nanorods for supercapacitor applications, *J. Electroanal. Chem.*, **747**, 130-135 (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**, 122-128 (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**, 318-326 (2015).

23. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene) films, *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 280-285 (2004).

24. M. Bazzaoui, J.I. Martins, E.A. Bazzaoui, *et al.*, Pyrrole electropolymerization on copper and brass in a single-step process from aqueous solution, *J. Appl. Electrochem.*, **34**, 815-822 (2004).

25. O. Stadnik, *Synthesis, electrochemical and photoelectrochemical properties of the oxide-hydroxide compounds of cobalt*, Diss. Kand. Chim. N., Kyiv, 2011.

26. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *J. Phys. Chem. B*, **114**(40), 12888-12896 (2010).

27. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, *et al.*, Theoretical description for anti-COVID-19 drug molnupiravir electrochemical determination over the poly(1,2,4-triazole)-co-squaraine dye composite with cobalt (III) oxyhydroxide, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **13**, 74 (2023).

28. V.V. Tkach, M.M. Kucher, N.Slyvka, *et al.*, The modeling for anti-Covid-19 drug molnupiravir electrochemical sensing on C_3N_4, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **13**, 446 (2023).

Como citar este artigo

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, A.O. da Silva, Y.G. Ivanushko, B.Y. Banul, T.V. Honchar, P.I. Yagodynets′, O.V. Luganska, Z.O. Kormosh, J.I.F. Martins, V.M. Odyntsova, M.P. Krasko, N. Karakoyun, A descrição matemática da detecção eletroanalítica da metaqualona, baseada na sua eletrooxidação sobre o compósito da poli(5-amino-1,4-naftoquinona) com o oxihidróxido de cobalto, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 258-239 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.109399

Artículo de investigación clínica / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.104048*

Reacciones adversas de hidroxicloroquina en pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 hospitalizados en una institución de alta complejidad de Bogotá, Colombia

Natalia Guzmán Zea, Diana María Chavarro Rodríguez*, Agustín Daniel Pava Pérez, María Alejandra González Rosario, Diana Catalina Zapata-Cristancho

Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología, Servicio Farmacéutico, Calle 163A #13B-60, Bogotá, Colombia.

*Autor para correspondencia: farmacovig@lacardio.org

Recibido: 6 de agosto de 2022

Revisado: 27 de febrero de 2023

Aceptado: 1 de marzo de 2023

Resumen

Objetivo: describir la frecuencia de las reacciones adversas asociados al uso *off-label* de hidroxicloroquina en pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 hospitalizados en una institución de alta complejidad de la ciudad de Bogotá, entre marzo y mayo de 2020. **Métodos:** estudio descriptivo de corte transversal con pacientes hospitalizados con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 que recibieron tratamiento con hidroxicloroquina entre el 23 de marzo y el 24 de mayo de 2020. Las reacciones adversas fueron recopiladas mediante búsqueda activa por químicos farmacéuticos. **Resultados**: 69 pacientes recibieron tratamiento con hidroxicloroquina (53,6% hombres, 62 años [RIC: 34]) con una duración promedio de tratamiento de 5 días [RIC: 4]. 71% de los casos fueron definidos como sospechosos y el 62% de los mismos se encontraban internados en servicios de hospitalización general. Se identificaron 16 eventos adversos. La prolongación del intervalo QT fue la reacción adversa de mayor frecuencia –clasificado en la mayoría de los casos como una reacción adversa no seria–, ocasionando la suspensión del tratamiento en 19% de los casos. Adicionalmente, se evidenció que en el 59,5% de los casos, la hidroxicloroquina fue administrada de manera concomitante con otros medicamentos relacionados con prolongación del intervalo QT. **Conclusión:** las reacciones adversas presentadas en pacientes que recibieron hidroxicloro-

quina como parte del manejo farmacológico de COVID-19 fueron: prolongación del intervalo QT, náuseas y aumento en niveles de transaminasas.

Palabras clave: Infecciones por coronavirus, hidroxicloroquina, pandemias, monitoreo de fármacos, farmacovigilancia.

SUMMARY

Adverse reactions of Hydroxychloroquine observed in suspected or confirmed COVID-19 inpatients in a highly specialized hospital in Bogotá, Colombia

Objective: to describe the frequency of adverse reactions associated with the off-label use of hydroxychloroquine in suspected or confirmed COVID-19 inpatients in a high complexity hospital in Bogotá between march and may, 2020. **Methods:** descriptive cross-sectional study comprising suspected or confirmed COVID-19 in patients receiving hydroxychloroquine between March 23th and May 24th, 2020. Adverse reactions were identified by active surveillance performed by pharmacists. **Results:** 69 patients received hydroxychloroquine (53.6% males, 62-year-old [IQR: 34]). The median length of treatment was 5 days [IQR: 4]. 71% of the cases were defined as suspected COVID-19 patients and 62% were hospitalized in general wards. QT interval prolongation was the most frequent adverse reaction –defined as non-serious adverse reaction in most cases–, causing suspension of treatment in 19% of the cases. In addition, it was found that hydroxychloroquine was concomitantly administered with several drugs also associated with QT interval prolongation. **Conclusion:** the adverse reactions observed in patients receiving hydroxychloroquine as pharmacological treatment for COVID-19 were QT interval prolongation, nausea and elevated transaminase levels.

Keywords: Coronavirus Infections, hydroxychloroquine, pandemics, drug monitoring, pharmacovigilance.

RESUMO

Reações adversas da hidroxicloroquina em pacientes com diagnóstico suspeito ou confirmado de COVID-19 internados em uma instituição de alta complexidade em Bogotá, Colômbia

Objetivo: descrever a frequência de reações adversas associadas ao uso off label de hidroxicloroquina em pacientes com diagnóstico suspeito ou confirmado de COVID-19 internados em uma instituição de alta complexidade na cidade de Bogotá, entre março e maio de 2020. **Métodos:** estudo transversal descritivo com pacientes hospitalizados com diagnóstico suspeito ou confirmado de COVID-19 que receberam tratamento com hidroxicloroquina entre 23 de março e 24 de maio de 2020. As reações adversas foram coletadas por meio de busca ativa por farmacêuticos químicos. Resultados: 69 pacientes receberam tratamento com hidroxicloroquina (53,6% homens, 62 anos [IQR: 34]) com duração média de tratamento de 5 dias [IQR: 4]. 71% dos casos foram definidos como suspeitos e 62% deles foram internados em serviços de internação geral. 16 eventos adversos foram identificados. O prolongamento do intervalo QT foi a reação adversa mais frequente – classificada na maioria dos casos como uma reação adversa não grave –, levando à interrupção do tratamento em 19% dos casos. Além disso, verificou-se que em 59,5% dos casos, a hidroxicloroquina foi administrada concomitantemente com outros medicamentos relacionados ao prolongamento do intervalo QT. **Conclusão:** as reações adversas apresentadas em pacientes que receberam hidroxicloroquina como parte do manejo farmacológico da COVID-19 foram: prolongamento do intervalo QT, náuseas e aumento dos níveis de transaminases.

Palavras-chave: Infecções por coronavírus, hidroxicloroquina, pandemias, monitoramento de medicamentos, farmacovigilância.

INTRODUCCIÓN

En el curso de la pandemia causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020, se hizo evidente la necesidad de contar con herramientas farmacoterapéuticas que permitieran mitigar o erradicar los efectos de este nuevo virus en la salud de los seres humanos, debido a sus enormes consecuencias a nivel sanitario y económico [1]. Para entonces, el COVID-19 ya había causado más de un cuarto de millón de muertes, por lo que los esfuerzos de la comunidad científica se orientaron a la búsqueda de alguna alternativa para tratarla entre los fármacos ya disponibles [2].

Desde el 2002, con el brote del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) ocasionado por otro tipo de coronavirus, se han venido conduciendo ensayos clínicos aleatorizados para probar una serie de nuevos agentes dirigidos a blancos terapéuticos como las vías de entrada viral, proteínas, proteasas, polimerasas y metiltransferasas, mostrando ciertos beneficios. A pesar de esto, hasta ahora no se ha encontrado una terapia antiviral específica, segura y efectiva que se recomiende para las infecciones por coronavirus [2].

Una de las estrategias empleadas cuando no hay medicamentos autorizados para una determinada enfermedad, y mientras se llevan a cabo los estudios de rigor, consiste en recurrir a medicamentos ya conocidos para el manejo de otras enfermedades y que podrían ayudar en el tratamiento de la nueva patología, a pesar de no contar con una autorización explícita por parte de la entidad regulatoria correspondiente (uso *off-label* o fuera de indicación*)*. A este proceso de búsqueda y eventual autorización de una nueva indicación para un medicamento que ya se conoce, que está autorizado y que, además, puede llevar en el mercado muchos años, se le conoce como reposicionamiento [3]. Esta es una estrategia interesante desde el punto de vista de seguridad porque aun cuando el uso del medicamento ocurre en un nuevo contexto, su perfil de seguridad, efectos secundarios, posología e interacciones farmacológicas ya son bien conocidos [2].

Dentro del abanico de posibles fármacos para el tratamiento de COVID-19 se consideró el uso de hidroxicloroquina (HCQ) en monoterapia o en combinación con otros medicamentos, basándose en los resultados de diferentes estudios realizados en China y Francia que reportaban su eficacia para inhibir la replicación *in vitro* del virus SARS-CoV-2. Si bien no existían ensayos clínicos para ese momento, dichos resultados fueron acogidos por la comunidad científica como un indicio de su posible efectividad *in vivo*, abriendo la puerta así a una de las primeras alternativas farmacológicas contempladas alrededor del mundo [4].

De acuerdo con las indicaciones terapéuticas autorizadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), la HCQ es un medicamento antiamebiano, antipalúdico, útil en el manejo de la artritis reumatoidea refractaria y del lupus eritematoso sistémico y discoide [5]. El mecanismo exacto de acción antiviral es poco conocido, pero se sabe que la HCQ aumenta el pH de los endosomas que el virus usa para la entrada celular y también interfiere con la glicosilación de la enzima convertidora de angiotensina-2 (ECA2), que es el receptor celular del SARS-CoV-2. Sin embargo, los niveles de 4-aminoquinolina que se requieren para inhibir la replicación de este virus *in vitro* son más altos que los niveles en plasma libre que se han observado en la prevención y el tratamiento de la malaria [6].

En términos de farmacocinética, la HCQ es un fármaco que se absorbe rápidamente después de su administración oral incluso en pacientes gravemente enfermos, alcan-

zando una biodisponibilidad que varía entre 25 y 100% [6]. Su tiempo de vida media oscila entre 32 y 50 días, se metaboliza por vía hepática dando lugar a sus metabolitos activos (entre ellos bidesetilcloroquina, desetilhidroxicloroquina y desetilcloroquina) y se excreta por vía renal. Adicionalmente, vale la pena mencionar que la HCQ es catalogada como un medicamento de estrecho margen terapéutico cuya toxicidad depende de la dosis administrada y su velocidad de eliminación [7, 8].

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante considerar que ciertas condiciones patológicas del paciente, entre ellas la falla renal o hepática, pueden alterar la concentración del medicamento a nivel plasmático, aumentando la probabilidad de presentar alguno de las reacciones adversas descritas en la tabla 1 [7, 8].

Tabla 1. Reacciones adversas atribuidos al uso de hidroxicloroquina [7].

Frecuencia	Reacción adversa
1% a 10%	
Oftálmico	Retinopatía (4%)
<1%	
Hematológico y oncológico	Hemólisis
Frecuencia no definida	
Dermatológico	Alopecia, rash buloso, discromía, eritema multiforme, exacerbación de psoriasis, dermatitis exfoliativa, decoloración del cabello, prurito, fotosensibilidad de la piel, rash cutáneo, urticaria
Endocrino y metabólico	Exacerbación de la porfiria, pérdida de peso
Gastrointestinal	Dolor abdominal, disminución del apetito, diarrea, náuseas, vómitos
Hematológico y oncológico	Agranulocitosis, anemia, anemia aplásica, insuficiencia de la médula ósea, leucopenia, trombocitopenia
Hepático	pruebas de función hepática anormales, insuficiencia hepática aguda
Hipersensibilidad	Angioedema
Sistema nervioso	Ataxia, mareos, labilidad emocional, fatiga, dolor de cabeza, irritabilidad, nerviosismo, pesadillas, psicosis, convulsiones, hipoacusia neurosensorial, vértigo

(*Continúa*)

Frecuencia	Reacción adversa
Neuromuscular y esquelético	Astenia, miopatía
Oftálmico	Cambios corneales, disminución de la agudeza visual, degeneración macular, maculopatía, trastorno del nistagmo, cambios en el pigmento retiniano, retinitis pigmentosa, escotoma, cambios en el color de la visión, defecto del campo visual
Ótico	Sordera, acúfenos
Respiratorio	Broncoespasmo
Reportes postmercadeo	
Cardiovascular	Miocardiopatía (<1%), prolongación intervalo QT en el ECG (<1%), torsades de pointes (<1%), arritmia ventricular (<1%)
Dermatológico	Pustulosis exantemática generalizada aguda (<1%), hiperpigmentación, síndrome de Stevens-Johnson (<1%), necrólisis epidérmica tóxica (<1%)
Endocrino y metabólico	Hipoglucemia, hipoglucemia grave (<1%)
Hematológico y oncológico	Neutropenia, pancitopenia
Sistema nervioso	Confusión, delirio, reacción extrapiramidal, alucinación, agitación psicomotora, tendencias suicidas (<1%)
Oftálmico	Queratopatía epitelial
Renal	Insuficiencia renal

Finalizando el mes de marzo de 2020, en vista de la necesidad inminente de implementar alguna terapia farmacológica para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2, se definió a nivel institucional iniciar con el uso de HCQ en escenarios de sospecha o infección confirmada por SARS-CoV-2 en pacientes hospitalizados, estableciendo un balance riesgo-beneficio favorable en el escenario de la pandemia recientemente declarada. Posteriormente, esta decisión fue ratificada a la luz del Boletín de Prensa No 134 de 2020, emitido por el Ministerio de Salud y Protección Social en consenso con la Asociación Colombiana de Infectología (ACIN), citando evidencia científica que, a pesar de no ser contundente, recomendó el uso bajo criterio del médico tratante [9, 10].

Poco tiempo después, el Ministerio de Salud y Protección Social emitió el Boletín de Prensa No 289 de 2020 mediante el cual retira la recomendación de uso de HCQ para el manejo de la infección por SARS-CoV-2, a la luz de nuevos estudios en donde no se observa un beneficio asociado al uso del medicamento sino un mayor riesgo de mortalidad. Asimismo, el Ministerio solicitó al INVIMA el retiro de la HCQ del listado UNIRS (Usos No Incluidos en el Registro Sanitario) para esta indicación [11].

Por lo anterior, el presente estudio propone describir la frecuencia de las reacciones adversas observadas durante el uso *off-label* de HCQ en pacientes hospitalizados con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 en una institución de alta complejidad de la ciudad de Bogotá.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo de corte transversal con una muestra de pacientes hospitalizados en una institución de alta complejidad de la ciudad de Bogotá, que recibieron tratamiento vía oral con HCQ entre el 23 de marzo y el 24 de mayo de 2020 por sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19.

El periodo de estudio se estableció en función del tiempo durante el cual se dio lugar al uso *off-label* del medicamento, partiendo del 23 de marzo de 2020, por iniciativa y consenso institucional, hasta el 24 de mayo de 2020 bajo direccionamiento del Ministerio de Salud y Protección Social colombiano.

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) fueron identificados por búsqueda activa mediante la revisión de historias clínicas por parte de farmacéuticos, junto con los informes realizados de manera verbal y escrita en el sistema de reporte de eventos de seguridad del hospital. Con base en lo anterior, se construyó una base de datos en Microsoft® Excel® a partir de la cual se determinó la estadística descriptiva de los datos. El análisis de cada una de las RAM y EA identificados se realizó empleando el algoritmo de causalidad de la OMS.

Resultados

Se incluyeron 69 pacientes que recibieron tratamiento con HCQ vía oral por sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19. La muestra está conformada por pacientes masculinos (53,6%) y femeninos (46,3%) con edad mediana de 62 años (RIC: 34). La duración de tratamiento promedio fue de 5 días (RIC: 4).

En cuanto a las variables clínicas, se observó que la mayoría de los pacientes (n=43, 62%) se encontraba en hospitalización general. Dentro de los antecedentes relevantes, el 23,2% (n=16) de la población contaba con diagnóstico de hipertensión arterial, mientras que el 59,4% (n=41) no presentaba ninguna comorbilidad de base.

Adicional al manejo con HCQ, se identificó que 46,2 % (n=41) de los pacientes recibieron medicamentos concomitantes como claritromicina que, según lo descrito en la literatura, pueden llegar a generar reacciones adversas similares a los atribuidos al uso de HCQ.

Tabla 2. Caracterización de la población de estudio.

Variable	Fa (%) n = 69
a. Variables sociodemográficas	
Sexo	
Masculino	37 (53,6)
Femenino	32 (46,3)
Edad	
Mediana (RIC)	62 (40 – 74)
LI - LS	(4 – 89)
b. Variables clínicas	
Comorbilidades	
Ninguna patología	41 (59,4)
Hipertensión arterial	16 (23,2)
Más de una patología	10 (14,5)
Diabetes	2 (2,9)
Servicio de internación	
Hospitalización general	43 (62,3)
UCI adultos	25 (36,2)
UCI pediátrica	1 (1,4)
Medicamentos concomitantes	
Claritromicina	37 (53,6)
Sin medicamentos concomitantes	28 (40,5)
Azitromicina	2 (2,9)
Metadona	1 (1,4)
Más de un medicamento concomitante	1 (1,4)
Duración del tratamiento	
Mediana (RIC)	5 (2-6)
LI - LS	(1-10)

Se detectaron 16 reacciones adversas en esta población de pacientes, siendo la prolongación del intervalo QT el más frecuente (n=12, 17,4%). Con respecto a la severidad de dichos eventos, se encontró que dos (12,5%) fueron clasificados como serios.

Tras la aparición de las reacciones adversas, se encontró que en la mayoría de los casos (n=14, 87,5%) se suspendió el tratamiento con HCQ. Sin embargo, un paciente (6,25%) concluyó su tratamiento sin modificaciones y otro paciente tuvo reducción de la dosis de HCQ (6,25%).

Tabla 3. Reacciones adversas observadas tras el uso de hidroxicloroquina.

Variable	**Fa (%) n = 69**
Reacciones adversas	
Prolongación del intervalo QT	12 (17,4)
Náuseas	2 (2,9)
Lesión renal aguda	1 (1,4)
Aumento de transaminasas oxacilítica y pirúvica (ALT y AST)	1 (1,4)
Severidad	*n=16*
Reacción adversa no serio	14 (87,5)
Reacción adversa serio	2 (12,5)

Las reacciones adversas observadas fueron analizadas por el programa institucional de Farmacovigilancia utilizando el algoritmo de causalidad de la OMS. El resultado de dicho análisis se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis de causalidad de l*as reacciones adversas* identificadas.

Clasificación OMS	**Fa (%) n = 16**
Posible	14 (87,5)
Probable	1 (6,25)
Condicional	1 (6,25)
Definitivo	0

Adicionalmente, se realizó una clasificación con respecto al diagnóstico definitivo de los pacientes que recibieron HCQ y la manifestación de las reacciones adversas. Se observó que el diagnóstico de COVID-19 fue confirmado en el 37,7% de los casos, mientras que el 60,9% de los pacientes fueron descartados en función del resultado de la prueba diagnóstica (RT-PCR, por sus siglas en inglés). De los pacientes con diagnostico confirmado, el 38,5% (n=10) presentaron algún EA.

Tabla 5. Distribución de las reacciones adversas de acuerdo con el diagnóstico confirmado o descartado COVID-19 del paciente.

	Diagnóstico COVID-19		
	Confirmado Fa (%) n=26	Descartado Fa (%) n=42	Desconocido Fa (%) n=1
No. de reacciones adversas	10 (38,5)	6 (14,3)	0

Discusión

En el contexto de la pandemia por COVID-19 declarada en marzo de 2020, en donde la ausencia de alternativas terapéuticas y la necesidad apremiante de contar con algún mecanismo para contener los efectos del virus en la población mundial, la HCQ se convirtió en un candidato prometedor gracias a los resultados de estudios que demostraron su eficacia *in vitro* contra SARS-CoV-2 [4], sumado a ventajas en términos de accesibilidad, bajo costo, efecto inmunomodulador y un perfil de seguridad ampliamente estudiado (tabla 1) [7, 12]. En vista de esto, múltiples consensos de expertos a nivel mundial comenzaron a recomendar el uso de HCQ para el tratamiento de COVID-19, motivo por el cual se evaluó y avaló, a nivel institucional, el uso del medicamento junto con el seguimiento de los pacientes a quienes les fue prescrito, con el fin de identificar oportunamente la aparición de cualquier evento de seguridad. Por esta razón, el presente estudio fue realizado con el fin de evaluar la seguridad de HCQ en condiciones de uso excepcionales, en donde el medicamento se utiliza a pesar de no contar con indicaciones de uso respaldadas por ensayos clínicos aleatorizados ni evidencia robusta.

De acuerdo con la literatura, los EA más frecuentemente descritos con relación al uso de este fármaco son la toxicidad ocular y hemólisis. Otro grupo de reacciones adversas descritas con una frecuencia inferior al 1%, pero de relevancia clínica debido a su posible impacto sobre la salud de los pacientes, son aquellos de origen cardiovascular, entre los que se encuentran las arritmias cardíacas (tabla 1).

Partiendo de los resultados obtenidos, se encontró que el EA más frecuentemente observado en la población de estudio fue la prolongación del intervalo QT (n=12), seguido de náuseas (n=2), lesión renal (n=1) y elevación de transaminasas (n=1) (tabla 2). Como parte del contexto clínico de la población de estudio, se exploró el potencial de interacciones farmacológicas con otros medicamentos, encontrando que en el 59,3% de los casos, HCQ se prescribió de manera concomitante con algún medica-

mento relacionado con la prolongación del intervalo QT, mientras que el 40,6% de la población presentaba alguna patología adicional al cuadro de COVID-19.

De acuerdo con esto, se identificaron factores que podrían explicar o facilitar la aparición de los EA evidenciados, entre ellos el uso de HCQ, las interacciones farmacológicas o el perfil de comorbilidades del paciente [9]. Dichos factores son consistentes con el resultado del análisis realizado por el programa de Farmacovigilancia del hospital empleando el algoritmo de evaluación de causalidad de la OMS en el que se evidenció que, de los 16 EA reportados, ninguno fue clasificado como definitivo (tabla 4).

Es preciso anotar que el 93,4% de los EA fueron identificados mediante paraclínicos fuera de rango (creatinina sérica, transaminasas, electrocardiograma), lo cual aporta objetividad a la identificación de posibles eventos de seguridad. No obstante, al detallar los EA descritos en la literatura (tabla 1) se evidencia que la mayoría se acompañan de un grado de subjetividad pues su determinación no ocurre a partir de exámenes de laboratorio y no cuentan con valores críticos que faciliten la toma de decisiones en la conducta médica. Lo anterior pone de manifiesto la relevancia de realizar una monitorización exhaustiva y concurrente de signos y síntomas durante el uso *off-label* de medicamentos, especialmente en una enfermedad nueva como COVID-19, acompañando la evaluación riesgo-beneficio en el momento de definir el inicio de tratamiento.

En cuanto al análisis de severidad, se pudo establecer que solo el 12,5% de los EA identificados fueron clasificados como serios de acuerdo con los criterios de severidad del INVIMA. Se clasifica como serios aquellos EA que amenacen la vida, requieran o prolonguen la hospitalización, generen alguna incapacidad u ocasionen la muerte del paciente [13]. A pesar de que el número de EA serios fue bajo en comparación con los EA no serios, se encontró que la conducta médica definida para la mayoría de los pacientes que recibieron tratamiento con HCQ y presentaron alguno de dichos EA correspondió a la suspensión del tratamiento (87,5%).

Para la detección del virus y confirmación del diagnóstico, se utilizó la prueba de RT-PCR (siglas en inglés de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Con base en los resultados de dicha prueba, se encontró que el 37,5% de los pacientes que presentaron EA durante el uso de HCQ no se encontraban infectados con el virus SARS-CoV-2. Asimismo, el diagnóstico del 60,8% de los pacientes a quienes se les administró HCQ fue descartado posteriormente debido al resultado negativo de la prueba de RT-PCR.

En el momento en que tuvo lugar la utilización *off-label* de HCQ aquí descrita, el procesamiento de esta prueba molecular y la entrega de resultados tomaba aproximadamente 4 días, por lo que la administración de HCQ iniciaba bajo criterio del médico

tratante ante la sospecha de COVID-19, y estaba sujeta a modificación de la conducta en función de la confirmación o descarte del diagnóstico. Si bien actualmente se conoce que el riesgo de utilizar este medicamento para el tratamiento de la infección viral no excede el beneficio asociado, dicha utilización se pudo justificar por el hecho de que la infección por SARS-CoV-2 constituía una enfermedad emergente de impacto mundial que requirió de intervenciones terapéuticas oportunas por la rápida evolución de los pacientes infectados, el poco conocimiento de sus diferentes formas clínicas de presentación, la variedad de complicaciones relacionadas con el cuadro viral y las consecuencias clínicas a corto, mediano y largo plazo que incluso hoy continúan estudiándose.

En Colombia, en el mes de mayo de 2020, se sugirió no utilizar HCQ como tratamiento de COVID-19 a la luz de las recomendaciones del Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-CoV-2 liderado por la ACIN y con la colaboración del Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud (IETS) [14]. Esta recomendación fue adoptada por la institución y consecuentemente cesó el uso ya descrito.

Entre las limitaciones del presente estudio puede considerarse que, al ser un estudio de carácter retrospectivo, no es posible establecer una asociación temporal entre la administración del medicamento y la aparición de los EA. Esto, al ser uno de los parámetros más relevantes para el análisis de causalidad, impide relacionar de manera definitiva la exposición al medicamento y la manifestación de reacciones adversas relacionadas con el mismo.

Adicionalmente, es posible que exista un sesgo de información a la luz de la literatura disponible respecto a las reacciones adversas relacionados con HCQ, y en función de ello, se hayan desestimado o no se hayan identificado eventos de seguridad que pudieron surgir durante la utilización de este medicamento en el contexto descrito. Esto repercute en posible subreporte de otros EA asociados al uso de HCQ.

No obstante, vale la pena destacar que el presente estudio aporta información relacionada con el uso real del medicamento en un contexto de pandemia único y atípico. Los resultados aquí descritos concuerdan con las reacciones adversas recopilados mediante reportes posmercadeo, lo cual denota la importancia de ejercer actividades de Farmacovigilancia incluso frente a medicamentos ampliamente conocidos y utilizados como HCQ, especialmente cuando se emplea en indicaciones que no se encuentran en registro sanitario.

Conflicto de interés

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud, Alocución de apertura del director general de la OMS en la rueda de prensa sobre la COVID19 celebrada el 11 de marzo de 2020. URL: https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020, consultado en septiembre de 2021.

2. E.C. Rodríguez-Venegas, O.L. Hernández-García, D.A. Denis-Piedra, Seguridad de la cloroquina y la hidroxicloroquina para el tratamiento de pacientes con COVID-19, *Revista Cubana de Medicina*, **59**(3), 1387 (2020).

3. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Información acerca del uso de hidroxicloroquina para el tratamiento de COVID-19. URL: https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2020-laaemps/informacion-acerca-del-uso-de-hidroxicloroquina-para-el-tratamiento-de-covid-19/, consultado en octubre de 2021.

4. V. Galvis, F.R. Spinelli, A. Tello, C.L. Sossa, J.D. Higuera, E.D. Gómez, S.E. Serrano, P.A. Camacho, F.G. Velez, Hydroxychloroquine as prophylaxis for coronavirus SARS-CoV-2 infection: Review of the ongoing clinical trials, *Archivos de Bronconeumología*, **56**(9), 606-608 (2020).

5. Consulta de datos del producto, Plataforma INVIMA para consulta de registros sanitarios, búsqueda activa hidroxicloroquina. URL: http://consultaregistro.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp., consultado en octubre de 2021.

6. Recovery Collaborative Group: P. Horby, M. Mafham, L. Linsell, J.L. Bell, N. Staplin, J.R. Emberson, M. Wiselka, A. Ustianowski, E. Elmahi, B. Prudon, T. Whitehouse, T. Felton, J. Williams, J. Faccenda, J. Underwood, J.K. Baillie, L.C. Chappell, S.N. Faust, T. Jaki, K. Jeffery, W.S. Lim, A. Montgomery, K. Rowan, J. Tarning, J.A. Watson, N.J. White, E. Juszczak, R. Haynes, M.J. Landray, Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19, *New England Journal of Medicine*, **383**(21), 2030-2040 (2020).

7. Lexicomp (Dakota del Norte), Hidroxicloroquina: información sobre medicamentos, UpToDate. URL: https://www-uptodate-com.ezproxy.unal.edu.co/contents/hydroxychloroquine-drug-information?search=hidroxicloroquina&source=panel_search_result&selectedTitle=1~148&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1, consultado en noviembre de 2021.

8. S. Gevers, M.S.G. Kwa, E. Wijnans, C. Van Nieuwkoop, Safety considerations for chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19, *Clinical Microbiology and Infection*, **26**(9), 1276-1277 (2020).

9. Ministerio de Salud y Protección Social, *Hidroxicloroquina y cloroquina se podrán usar para tratamiento de Covid-19, 2020*. URL: https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Hidroxicloroquina-y-cloroquina-se-podran-usar-para-tratamiento-de-covid-%E2%80%93-19.aspx, consultado en septiembre de 2021.

10. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, *Uso de los medicamentos cloroquina e hidroxicloroquina para el tratamiento de COVID-19*, 2020. URL: https://www.invima.gov.co/uso-de-los-medicamentoscloroquina-e-hidroxicloroquina-para-el-tratamiento-de-covid-19, consultado en septiembre de 2021.

11. Ministerio de Salud y Protección Social, *Se retira recomendación de cloroquina, hidroxicloroquina y lopinavir/ritonavir para tratar covid-19*, 2020. URL: https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Se-retira-recomendacion-de-cloroquina-hidroxicloroquina-y-lopinavir-ritonavir-para-tratar-covid-19.aspx, consultado en septiembre de 2021.

12. N. Younis, R. Zareef, S. Al Hassan, F. Bitar, A. Eid, M. Arabi, Hydroxychloroquine in COVID-19 patients: Pros and cons, *Frontiers in Pharmacology*, **11,** 597985 (2020).

13. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Resolución 2004009455 del 28 de mayo de 2004. "Por la cual se establece el reglamento relativo al contenido y periodicidad de los reportes, de que trata el artículo 146 del decreto 677 de 1995". URL: https://www.invima.gov.co/documents/20143/828720/resolucion2004009455%202004.pdf/14bea02f-1fb0-79ed-767d-6c7bf6f18aaa, consultado en enero de 2022.

14. Asociación Colombiana de Infectología-ACIN, Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARSCoV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud, *Recomendaciones para el manejo de infección por SARS CoV-2-COVID-19*, 2020. URL: https://acin.org/images/guias/coronavirus/Comunicado_10.pdf, consultado en septiembre de 2021.

Cómo citar este artículo

N. Guzmán-Zea, D.M. Chavarro-Rodríguez, A.D. Pava-Pérez, M.A. González Rosario, D.C. Zapata-Cristancho, Reacciones adversas de hidroxicloroquina en pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19 hospitalizados en una institución de alta complejidad de Bogotá, Colombia, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 540-554 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.104048

Artigo corto / *https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101478*

Potencial antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida tropicalis*

Maelle Santos Araújo[1a], Maria Alice Araújo de Medeiros[2b], Millena de Souza Alves[2c*], Bernadete Santos[2d], Aleson Pereira de Sousa[3e], Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira[4f], Edeltrudes de Oliveira Lima[5g], Gabriela Lemos de Azevedo Maia[6h], Abrahão Alves de Oliveira Filho[1i]

[1] Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.

[2] Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.

[3] Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

[4] Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz – RN, Brasil.

[5] Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

[6] Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brasil.

Correios eletrônicos:

[a] araujomaelle@hotmail.com

[b] medeirosallice22@gmail.com

[c] millenaasouzaa@gmail.com

[d] bernadetes672@gmail.com

[e] aleson_155@hotmail.com

[f] Heloisambf@gmail.com

[g] edelolima@yahoo.com.br

[h] gabriela.lam@gmail.com

[i] Abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

Recebido: 3 de março de 2022

Revisado: 27 de fevereiro de 2023

Aceto: 2 de março de 2023

Resumo

Introdução: *Candida tropicalis* é um agente frequente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência. As candidemias estão relacionados aos animais. Consequentemente, os fármacos que afetam as células fúngicas também podem afetar as células humanas, fato que torna difícil o tratamento das infecções fúngicas. O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade da ampliação de estratégias que impeçam a sua dispersão entre os fungos, como já aconteceu com as bactérias, que se depara distribuída e fora de controle. Por isso, é necessário, novas formas de estudos sobre alternativas terapêuticas, os fitoterápicos podem ser utilizados como nova opção de tratamento. **Objetivo:** determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis.* **Metodologia:** utilizou-se o método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre a técnica de microdiluição em caldo. **Resultados:** obteve-se uma CIM50 de 256 μg/mL para as cepas do fungo. **Conclusão:** dessa maneira, pode-se observar a possível utilização desta substância para posteriores tratamentos das doenças originadas pelas leveduras de *Candida tropicalis.*

Palavras-chave: Micologia, fitoterapia, *Candida tropicalis*.

Summary

Antifungal potential of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* against *Candida tropicalis*

Introduction: *Candida tropicalis* is a frequent agent of candidemia in Brazilian hospitals, being the second most commonly isolated species. Infection by this agent can occur in patients of all ages, but it affects adult and elderly patients more frequently. Candidemias are related to animals. Consequently, drugs that affect fungal cells can also affect human cells, making it difficult to treat fungal infections. The increase in resistance to antifungals alerts to the need to expand strategies that prevent their dispersion among fungi, as has already happened with bacteria, which are found to be distributed and out of control. Therefore, new forms of studies on therapeutic alternatives are necessary, herbal medicines can be used as a new treatment option. **Objective:** to determine the minimum inhibitory concentration of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* on *Candida tropicalis* strains. **Metho-**

dology: the method of determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used on the broth microdilution technique. **Results:** a MIC50 of 256 μg/mL was obtained for the fungus strains. **Conclusion:** in this way, it is possible to observe the possible use of this substance for further treatment of diseases caused by *Candida tropicalis* yeasts.

Keywords: Mycology, phytotherapy, *Candida tropicalis.*

Resumen

Potencial antifúngico de la fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* frente a *Candida tropicalis*

Introducción: *Candida tropicalis* es un agente frecuente de candidemia en los hospitales brasileños, siendo la segunda especie más comúnmente aislada. La infección por este agente puede ocurrir en pacientes de todas las edades, pero afecta con mayor frecuencia a pacientes adultos y ancianos. Las candidemias están relacionadas con los animales. En consecuencia, los medicamentos que afectan a las células fúngicas también pueden afectar a las células humanas, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones fúngicas. El aumento de la resistencia a los antifúngicos alerta sobre la necesidad de ampliar estrategias que eviten su dispersión entre los hongos, como ya ha ocurrido con las bacterias, que se encuentran distribuidas y fuera de control. Por lo tanto, son necesarias nuevas formas de estudios sobre alternativas terapéuticas, los medicamentos a base de hierbas pueden ser utilizados como una nueva opción de tratamiento. **Objetivo:** determinar la concentración inhibitoria mínima de la fase cloroformo de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis*. **Metodología:** se utilizó el método de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) sobre la técnica de microdilución en caldo. **Resultados:** se obtuvo una CIM50 de 256 μg/mL para las cepas del hongo. **Conclusión:** de esta manera, es posible observar el posible uso de esta sustancia para el tratamiento posterior de enfermedades causadas por levaduras *Candida tropicalis*.

Palabras clave: Micología, fitoterapia, *Cándida tropicalis.*

Introdução

Candida tropicalis é um agente frequente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência [1].

O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontra disseminada e fora de controle [2]. A resistência aos azólicos em cepas de *Candida tropicalis* é devido ao aumento da expressão do gene ERG11, associada com uma mutação missense nesse gene [3].

Os medicamentos fitoterápicos têm sido um recurso para a saúde do ser humano. Durante milênios, o homem enraizou seus conhecimentos a fim da procura por melhorias nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades [4].

As plantas medicinais são importantes por fornecerem matéria-prima para a síntese de drogas, além de serem utilizadas como agentes terapêuticos alternativos. O emprego das plantas é supervalorizado no uso tradicional com base nos seus benefícios medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento sobre a dose e a parte empregada da planta, além de suas propriedades terapêuticas, pois existem aquelas que são altamente tóxicas, mesmo em pequenas doses [5].

A família Lamiaceae é composta por aproximadamente 240 gêneros e 7200 espécies, ocorrendo em todo o mundo desde regiões tropicais até áreas de clima temperado, com exceção da Antártida. No Brasil, são encontrados 32 gêneros e 496 espécies, sendo muitas destas espécies endêmicas do semiárido nordestino, com destaque para o gênero *Hyptis* e *Rhaphiodon* [6].

Dentre os representantes da família Lamiaceae na Caatinga, pode-se destacar o gênero *Raphiodon,* representado pela espécie *Raphiodon echinus* e considerado como característico dessa região [7]. *Raphiodon echinus* é uma Lamiaceae rasteira, cuja distribuição é registrada nos estados de Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Minas Gerais [8].

O presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis.*

Metodologia

A fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* foi cedido pela equipe da professora Dr. Gabriela Lemos de Azevedo Maia-Univasf. Para atingir os testes farmacológicos, a

substância foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água destilada. A concentração de DMSO foi inferior a 0,1% v/v.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antifúngica foi realizada em cinco cepas selecionadas de *Candida tropicalis* ATCC 13803, CT 14, LM 31, LM 36. Todas as cepas de microrganismos utilizados neste estudo fazem parte da MICOTECA do Laboratório de Micologia/DFP/CCS/UFPB.

A atividade antifúngica foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Cleeland e Squires (1991) [9], Hadacek e Greger (2000) [10] e CSLI (2008) [11].

As CIMs do *Raphiodon echinus* foram determinadas contra cepas de *Candida tropicalis* pela técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente, 100 μL de caldo de dextrose Sabouraud foram adicionados aos poços da placa de petri com 96 poços e fundo em "U". Em seguida, 100 μL dos produtos da emulsão foram dispensados nos poços da primeira fila da placa. Uma razão de duas concentrações foram obtidas de 1024 μg/mL a 2 μg/mL, de modo que a primeira linha da placa encontrasse a maior concentração e, por último, a menor concentração. Finalmente, 10 μL do inóculo foram adicionados às cavidades, onde cada coluna de placa se referiu a uma cepa fúngica, em particular.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas testadas, juntamente com o controle de sensibilidade, essas cepas de ação antifúngica consideradas padrões em uso clínico (Nistatina 100 UI/mL). Para verificar a ausência de interferência do solvente nos resultados, um controle foi colocado nas cavidades 100 μL do caldo duplamente concentrado, 100 μL de *Raphiodon echinus* e 10 μL da suspensão foi feita.

As placas foram seladas assepticamente e incubadas a 35 ºC durante 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico. O teste foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois testes.

Resultados e discussão

Os resultados da CIM (Concentração inibitória mínima) de *Raphiodon echinus* contra as cepas de *Candida tropicalis* são mostradas na tabela 1. Para o teste de microdiluição em caldo, a fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* apresentou CIM50 de 256 μg/mL para as cepas do fungo.

Sartoratto *et al*. (2004) [12] sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando possuem CIM de até 500 μg/mL, moderada para CIM de 600 a

Tabela 1. Atividade antifúngica para determinação da CIM da fase clorofórmica do Raphiodon echinus contra cepas de Candida tropicalis.

Substância/cepa	***Candida tropicalis* ATCC 13803**	***Candida tropicalis* LM 14**	***Candida tropicalis* LM 31**	***Candida tropicalis* LM 36**
1024 µg/mL	+	+	+	+
512 µg/mL	-	+	+	+
256 µg/mL	-	-	+	+
128 µg/mL	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

(-) Nenhuma inibição (+) Inibição

1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL. Sendo assim, de acordo com os resultados da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus*, pode ser considerado forte inibidor frente às cepas *Candida tropicalis.*

Entre os representantes da família Lamiaceae na Caatinga, destaca-se o gênero *Raphiodon,* monotípico, representado pela espécie *Raphiodon echinus* (Nees & Mart) *Schauer* é considerado como característico dessa região [7]. Esta espécie se destaca por apresentar como principais características a presença de cálice frutífero com lacínios espinescentes e hábito prostrado.

Além disso, *R. echinus* é tida como invasora, típica da caatinga, sendo encontrada especialmente em áreas sujeitas a inundação temporária, à beira da estrada e em áreas de cultivo abandonadas e apresenta diversa distribuição no Brasil, sendo registrada nos Estados de Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Minas Gerais [13-16]. Em estudos realizados para a região Nordeste, *R. echinus* é citado em levantamentos feitos em Pernambuco [16], Paraíba [17] e Bahia [15].

Costa *et al*. (2017) [18] verificaram a capacidade antifúngica dos extratos de *R. echinus* contra cepas de diferentes espécies de Candida e observaram o efeito modulador destes extratos quando conjugados a antifúngicos sintéticos.

Pio *et al*. (2018) [19] realizou uma busca acerca dos conhecimentos e usos de plantas medicinais dos habitantes das ilhas do rio São Francisco. *R. echinus* apresentou-se como a planta, cujos efeitos e propriedades, eram mais conhecidos e usados corretamente pela população. No mesmo estudo foram avaliados os efeitos antimicrobianos

dos extratos aquoso e etanólico de *R. echinus* por meio da técnica de microdiluição, contra cepas bacterianas. Foi possível observar que o extrato aquoso não apresentou efeito desejável sobre as cepas bacterianas, entretanto o extrato etanólico de *R. echinus* apresentou efeito moderado. A fração acetato de etila do extrato etanólico, apresentou forte potencial antibacteriano sobre as cepas estudadas.

Duarte *et al*. (2016) [20] testaram as propriedades moduladoras do óleo essencial de *R. echinus* quando associado a antimicrobianos, contra cepas fúngicas de *C. albicans, C. krusei, C. tropicalis* e cepas bacterianas de *E. coli, S. aureus* e *Pseudomonas*. No estudo foi verificado uma reduzida atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial, mas um forte efeito modulador quando associado aos antimicrobianos. Segundo os pesquisadores, o óleo essencial também apresenta uma forte atividade quelante de ferro.

Segundo um estudo realizado por Ferreira *et al*. (2019) [21], verificou-se que o do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) apresenta um forte efeito antifúngico contra cepas de *C. tropicalis*. Desta forma, sugere-se que este composto pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por esse fungo.

Conclusão

Com a concretização desta pesquisa, pode-se compreender a abundante atividade antifúngica de *Raphiodon echinus* diante as cepas da espécie *Candida tropicalis*. Através da análise dos resultados, foi possível verificar que o produto natural testado proporcionou um forte efeito antifúngico sobre as cepas de *Candida tropicalis* em relação as cepas de origem clínica. Dessa maneira, pode-se observar a possível utilização desta substância para posteriores tratamentos das doenças originadas pelas leveduras de *Candida tropicalis*, destacando assim a obrigação de mais estudos para delinear esta atividade farmacológica.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. M. Nucci, A.L. Colombo, Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., **58**(1), 77-82 (2007).

2. M.M. Canuto, F.G. Rodero, Antifungal drug resistance to azoles and polyenes, *Lancet Infect. Dis*., **2**(9), 550-563 (2002).

3. P. Vandeputte, G. Larcher, T. Bergés, G. Renier, D. Chabaise, J. P. Bouchara, Mechanisms of azole resistance in clinical isolate of *Candida tropicalis*, *Antimicrob. Agents Chemother*., **49**(11), 4608-4615 (2005).

4. F.R. Moreira, F.Q. Oliveira, Levantamento de plantas medicinais e fitoterapicos utilizados na comunidade quilombola - pontinha de paraopeba, Minas Gerais, Brasil, *Rev. Bras. Cienc. Vida*, **5**(5), Art 7, 1-24(2017).

5. J. Zhan, P. Zhou, A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicology*, **186**(1-2), 119-123 (2003).

6. R.M. Harley, Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon, *Rodriguésia*, **63**(1), 129-144 (2012).

7. R. Harley, In search of Labiatae in Eastern Brazil, *Vitex*, **1**, 5-7 (2000).

8. C.T.V. Dias, L.H.P. Kill, Ecologia da polinização de *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer (Lamiaceae) em Petrolina, PE, Brasil, *Acta Bot. Bras*., **21**(4), 977-982 (2007).

9. R. Cleeland, E. Squires, Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections, em: V. Lorian (editor), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed., Williams & Wilkins, New York (NY), 1991, pp. 739-788.

10. F. Hadacek, H. Greger, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice, *Phytochem. Anal*., **11**, 137-147 (2000).

11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, *Approved Standard-Second Edition*, CLSI document M27-A3, Wayne (PA), 2008.

12. A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Figueira, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Braz. J. Microbiol*., **35**, 275-280 (2004).

13. R.M. Harley, Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and is relatives in Brasil, em: *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1988, pp. 71-80.

14. R.M. Harley, B.L. Stannard, *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil*, Royal Botanic Gardens, Bahia, 1995, 877 p.

15. R.M. Harley, The Labiatae of Bahia: A preliminary checklist, *Sitientibus*, **15**, 11-21 (1996).

16. U.P. Albuquerque, C.F.C.B.R. Almeida, Diversidade da família Labiatae em Pernambuco, em: M. Tabarelli, J.M.C. Silva (orgs.), *Diagnóstico da Diversidade de Pernambuco*, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Recife, 2002, pp. 295-304.

17. M.R.V. Barbosa, M.F. Agra, E.V.S.B. Sampaio, J.P. Cunha, L.A. Andrade, Diversidade Florística na Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba, em: M. Tabarelli, J.J.P. Cabral, K.C. Porto (orgs.), *Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação*, (Série Biodiversidade, 9), Brasília, 2004, pp. 111-122.

18. A.R. Costa, J.L. Silva, K.R. Lima, M.I. Rocha, L.M. Barros, J.G.M. Da Costa, H.D.M. Coutinho, *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial, *Microb. Pathog*., **107**, 280-286 (2017).

19. I.D.S.L. Pio, A.L. Lavor, C.M.D. Damasceno, P.M.N. Menezes, F.S. Silva, G.L.A. Maia, Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco River, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae), *Braz. J. Biol*., **79**, 87-99 (2018).

20. A. Duarte, I.R.A. De Menezes, M.F.B.M. Braga, N.F. Leite, L.M. Barros, E.P. Waczuk, M.E. Burguer, Antimicrobial activity and modulatory effect of essential oil from the leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on some antimicrobial drugs, *Molecules*, **21**(6), 743 (2016).

21. J.L.S. Ferreira, J.N.M. Cavalcante, D.S. Siqueira, R.V. Bezerra, L.A. Delgado, H.M.B.F. De Oliveira, A.O. Filho, Comparação da atividade antifúngica do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (lamiaceae) contra cepas *Candida tropicalis*, *Rev. UNINGÁ*, **56**(3), 1-8 (2019).

Como citar este artigo

m. Santos-Araújo, M.A. Araújo de Medeiros, M. de Souza-Alves, B. Santos, A. Pereira de Sousa, H.M.B. Fernandes de Oliveira, E. de Oliveira-Lima, G.L. de Azevedo-Maia, A.A. de Oliveira Filho, Potencial antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida tropicalis*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*., **52**(1), 555-563 (2023). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101478

Resúmenes de los trabajos presentados en FarmaCosmética 2023, realizado en Bogotá D. C., Colombia, durante Marzo 8-10, 2023

Ponencia 1

Desarrollo de un modelo celular para la evaluación de alternativas de tratamiento de leucemia linfoblástica aguda tipo B de mal pronóstico

Camilo Ernesto Moreno Cristancho[1,2*], Ana Isabel Ramos Murillo[1,3], José Arturo Gutiérrez Triana[2], Rubén Darío Godoy Silva[1]

[1] Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá D. C., Colombia.

[2] Grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiologia Molecular, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

[3] Departamento de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación SafeLab, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

Actualmente, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. Para el año 2018 se atribuyeron a esta enfermedad alrededor de 18 millones de casos y 9,5 millones de muertes. La incidencia de cánceres leucémicos en el mundo es cerca del 2,7% con una cifra de 474 mil casos nuevos y alrededor de 322 mil muertes. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es uno de los cuatro tipos principales de leucemia y tiene una incidencia global de 13,5%, con una mayor frecuencia de diagnóstico entre niños, adultos jóvenes y naciones en desarrollo. El escenario en Colombia para la LLA no es alentador, ya que es el tercer país en el mundo con mayor incidencia de este tipo de cáncer, con una tasa de 2,3 casos para hombres y 2,1 para mujeres por cada 100 mil habitantes, siendo el cáncer más común en la población de menores de 15 años con un 25% y un 1% en la población adulta, teniendo el último grupo etario el peor pronóstico. Para la leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) existen estudios previos en pacientes colombianos adultos respondedores y no respondedores al tratamiento quimioterapéutico, donde se encontraron tres genes diferencialmente expresados asociados a un mal pronóstico ID1, ID3 e IGJ. La relevancia de los genes asociados al mal pronóstico en la población colombiana crea la necesidad de

generar modelos que permitan estudiar los aspectos biológicos, químicos y farmacológicos de estos. Por lo tanto, el desarrollo de este trabajo se centró en el estudio del efecto quimioterapéutico de fármacos utilizados en el tratamiento contra LLA-B, generando estrategias moleculares y genéticas en líneas celulares (HEK-293T Y NALM-6) que permitan la sobreexpresión del gen IGJ, dada la escasa información de este gen en la relevancia del cáncer en Colombia y en el mundo. Para llevar a cabo el estudio se utilizó la herramienta de activación génica CRISPRa (CRISPR de activación) y sus respectivas secuencias guías (ARN guías), para el gen IGJ. Los constructos plasmídicos se transfectaron en una línea celular embrionaria de riñón HEK-93T, como método preliminar de detección de expresión génica y posteriormente en la línea de estudio de LLA-B NALM-6. Seguido de esto, se evaluó mediante PCR en tiempo real, la sobreexpresión del gen IGJ, para así conocer los niveles de expresión y realizar ensayos de proliferación y citotoxicidad con quimioterapéuticos. De esta forma se estableció una línea celular temporal para el estudio de fármacos actuales en quimioterapia y fármacos prometedores, para así permitir el avance hacia alternativas en el tratamiento de LLA-B en pacientes colombianos.

Ponencia 2

Detección y tratamiento de *Mycoplasma* sp. presente en líneas celulares animales empleadas en la industria farmacéutica

María Camila Ferrucho Calle[1,2*], Rubén Darío Godoy Silva[1], Ana Isabel Ramos Murillo[1,2,3]

[1] Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá D. C., Colombia.

[2] Departamento de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación SafeLab, Bogotá D. C., Colombia.

[3] Departamento de Investigación y Desarrollo Intek Group SAS, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

La aplicación de cultivos celulares se introdujo durante del siglo XX con la producción de vacunas, el estudio de tejidos, la regeneración celular y la evaluación de la expresión génica de El uso de cultivos celulares permitió la generación de modelos para el estudio en diferentes áreas como la medicina, la industria farmacéutica y cosmética, entre otros. El empleo de cultivos celulares en las diferentes áreas de inves-

tigación involucra diferentes medidas control y cuidado en parámetros como uso de productos químicos y contaminación por microorganismos como *Mycoplasma* sp. En el caso de la presencia de *Mycoplasma* sp., las afectaciones en la línea celular contaminada implican efectos económicos, biológicos que pueden conllevar a la invalidez de resultados obtenidos con las líneas celulares contaminadas e implicar pérdidas cuantiosas de insumos, tiempo y productos en la industria bio-farmacéutica, lo que convierte el control de este microorganismo en una prioridad fundamental para el éxito en la producción de biofármacos. Debido a las consecuencias que conllevan la presencia de este patógeno, "la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos" FDA y "Farmacopea de los Estados Unidos" USP, recomiendan realizar protocolos de regulación y procesos de seguimiento con el fin de detectar líneas celulares contaminadas y controlar la posibilidad de contaminación. No obstante, a pesar del reconocimiento del impacto de la contaminación con este microorganismo en la industria bio-farmacológica, los entes de regulación no determinan el método apropiado para su detección, por lo que establecer oportunamente de la presencia de *Mycoplasma* sp. en las líneas celulares depende de la selección de un método apropiado para su uso en cada laboratorio o industria, esta selección involucra la evaluación de la diversidad de métodos existentes [detección molecular, técnicas alternativas y tradicionales], el tiempo de implementación, el costo y el límite de detección con el fin de poder establecer acertadamente la presencia de *Mycoplasma* sp. En este trabajo se implementó la detección mediante tres métodos con diferentes espectros de detección del microorganismo, como es el caso de PCR, inmunotinción con DAPI y bioluminiscencia, con el fin de realizar una comparación de los métodos, su sensibilidad para la detección del microrganismo, costo y tiempo de detección. Así mismo, se evaluó el efecto de la contaminación por *Mycoplasma* sp. en el crecimiento de las líneas celulares en estudio (L929 y HEK 293) mediante ensayo de proliferación celular. Finalmente, siendo el tratamiento de las líneas contaminadas una alternativa considerable con el fin de evitar la pérdida de la línea celular, se trataron las células con Plasmocin® (Invivogen), con el fin de erradicar la contaminación presente y evaluar el efecto de este tratamiento en la velocidad de crecimiento de las líneas celulares contaminadas. Con el desarrollo del presente trabajo se seleccionó entre los métodos evaluados el más adecuado para la detección de *Mycoplasma* sp., desde el punto de vista económico y técnico. Así mismo, se determinó posibilidad de uso de las líneas celulares tratada en futuros estudios de citotoxicidad y proliferación celular.

Ponencia 3

Estrategias para el desarrollo de capacidades innovadoras en la solución del acceso a dispositivos médicos combinados, una mirada desde las ciencias farmacéuticas

Bibiana Margarita Vallejo[1]*, Fabián Andrés Camargo[1], Edward Andrés Rodríguez[1], Helber de Jesús Barbosa[1]

[1] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

El diseño de productos sustentado en metodologías basadas en la calidad supone la apropiación de bases sólidas del conocimiento sobre materiales, tecnología, propiedades funcionales, así como su respectiva correlación, para llevar al mercado un producto competitivo y adaptado a las necesidades del paciente. En el caso de los dispositivos médicos combinados (DMC), su acceso se limita tanto por el costo, como por la complejidad en el diseño, especialmente en centros de salud donde no existe personal con altos grados de especialización para su manejo. En esta investigación se identificó la epistaxis como un problema frecuente de la población, donde no todos los pacientes encuentran una solución, especialmente aquellos con menores recursos. Por tal razón se propuso como reto de innovación el diseño de un DMC como sistema alternativo para superar las deficiencias identificadas de los productos del mercado. Para el desarrollo se partió del conocimiento sobre la microestructura del sistema y entendimiento de la dinámica de un DMC, en su interacción con la superficie de la mucosa nasal; en esta etapa se consideraron elementos de la ciencia de micro fluidos como la aproximación más idónea en la comprensión de los fenómenos de transporte de masa que ocurren durante la liberación de un principio activo y se utilizó la dinámica de fluidos computacional como herramienta de estudio *in silico*. Durante la siguiente fase se estudió experimentalmente la forma, estructura y desempeño de diferentes prototipos de transporte del tipo película polimérica, para la comprensión de los mecanismos de acción del DMC para uso en epistaxis. Como resultado, se obtuvo un prototipo funcional de sistema de transporte, sustentado en un desarrollo sistemático que valida la estrategia de diseño propuesta y responde al reto de innovación, como una contribución desde las Ciencias Farmacéuticas a la solución de problemas de salud para la población colombiana.

Ponencia 4

Desafíos de procesabilidad y disolución en el desarrollo de una tableta con dos activos de alta concentración, por vía seca con fines de bioexención

Laura González Fajardo[1]*, Alba Lucía Valenzuela[1]

[1] Laboratorios Legrand, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

El desarrollo de una forma farmacéutica sólida, con fármacos clase III, que pueda demostrar bioequivalencia mediante la comparación de perfiles de disolución tiene dos grandes requerimientos regulatorios: 1) la fórmula debe ser cuantitativamente equivalente al producto de referencia y 2) el producto debe tener una disolución muy rápida (≥ 85% en 15 minutos). Estos requerimientos usualmente conllevan a una serie de desafíos de diseño para garantizar la procesabilidad de la fórmula, ya que la fórmula misma no puede ser modificada, así como para garantizar la disolución muy rápida de los activos. A partir de las características del producto de referencia, se estableció que para el desarrollo de un producto multifuente se debía contemplar las siguientes restricciones adicionales en el espacio de diseño y en su perfil de calidad: 1) los activos constituyen el 73% de la fórmula, 2) manufactura por vía seca y 3) ausencia de un aglutinante clásico para la vía seca. Una combinación racional de parámetros críticos de fórmula y de parámetros críticos de proceso permitió el adecuado desarrollo del producto. Por una parte, para garantizar la procesabilidad de las tabletas se evaluó entre otros, el impacto del tamaño de partícula de los activos, del uso de diferentes referencias de celulosa microcristalina y la inclusión de una etapa de granulación en seco versus compresión directa con impacto directo en el peso, la dureza y la integridad mecánica de las tabletas. Por otra parte, un control estricto de la dureza de las tabletas, el área superficial de las tabletas y de la ganancia de peso durante el recubrimiento aseguró la disolución muy rápida de los activos. El presente trabajo ilustra por tanto una aproximación racional desde la calidad por diseño al desarrollo de un producto con requerimiento de bioequivalencia por bioexención.

Ponencia 5

Carbonato de calcio por biosíntesis como vehículo para activos anticancerígenos de baja solubilidad

Gianina Pérez Luna[1]*, Sandra Navarro[1], Ana Elisa Casas[1]

[1] Universidad Pontificia Bolivariana, Cecoltec Services, Medellín, Colombia.

Resumen

El propósito de este estudio se orientó al desarrollo de una cápsula de carbonato de calcio, que permitiera albergar activos anticancerígenos para ser transportados hasta el colon. El carbonato de calcio utilizado fue obtenido por una ruta biotecnológica mediada por un microorganismo (*Bacillius cereus*), obteniendo predominantemente el polimorfo de vaterita. Este polimorfo de carbonato de calcio posee una morfología esférica y porosa bastante atractiva para ser aprovechado como material de pared en la encapsulación de activos. Es así como, se diseña ruta de encapsulación de activos anticancerígenos con carbonato de calcio usando como molécula modelo resveratrol, en donde se estudió la interacción fisicoquímica de entre el material pared (carbonato de calcio) y el activo (resveratrol) mediante ensayos de ángulo de contacto e isotermas de adsorción, que permitieron conocer la capacidad de carga de la cápsula y la interacción entre ellos; y así encontrar parámetros de operación para su encapsulación por liofilización. Se caracterizaron las propiedades morfológicas de las cápsulas mediante SEM- EDS y DRX. Utilizando soluciones con pH y osmolaridad simuladas de estómago y colon, se obtuvieron perfiles de liberación controlada de resveratrol en el tiempo usando espectroscopia UV-Visible. Ensayos preliminares de liberación In Vitro confirman que las capsulas poseen una alta capacidad de carga de resveratrol y capacidad de liberación sostenida en el tiempo.

Ponencia 6

Síntesis, caracterización y evaluación de la capacidad anticancerígena de nanopartículas de quitosano-ácido fítico cargadas con metotrexato obtenidas por gelación iónica

Yhors Ciro[1*], John Rojas[1,2], Ana Di Virgilio[1], María Alhajj[1], Gustavo Carabali[1], Constain Salamanca[1,2]

[1] Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

[2] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades de creciente impacto en la salud pública mundial. Entre ellos, el tipo colorrectal es el tercero más común y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo occidental. Afortunadamente, la vehiculización de agentes anticancerígenos en nanopartículas poliméricas (NPs), permite el aumento de la efectividad del tratamiento anticancerígeno, disminución de efectos adversos y bloqueo de los mecanismos de resistencia de las células cancerígenas. En este estudio, se sintetizaron NPs por el entrecruzamiento de quitosano con ácido fítico mediante gelación iónica, asistida por ultrasonido de alta intensidad a amplitudes de 40% y 60% para la encapsulación de metotrexato (MTX). La caracterización de las NPs abarcó mediciones de su tamaño, índice de polidispersidad, potencial zeta y eficiencia de encapsulación. Además, estudios de estabilidad se realizaron a 4 °C y 40 °C y la liberación *in-vitro* se realizó a pH de 7,4. Asimismo, la actividad citotóxica se evaluó mediante el ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliu (MTT) en la línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29. De esta forma, se obtuvieron NPs con tamaños <300 nm, con potencial zeta positivo y baja polidispersidad, excepto para las NPs generadas a 40% de intensidad ultrasónica. Más aún, las eficiencias de encapsulación estuvieron entre 36% y 60%, y el MTX se liberó por mecanismos de relajación/hinchamiento de las NPs. Además, estas NPs mostraron una adecuada estabilidad física a 40 °C y aumentaron la actividad citotóxica del MTX, demostrando que pueden ser una alternativa en el tratamiento del cáncer de colorrectal.

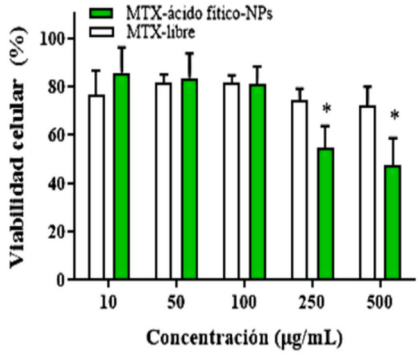


Figura 1. Resultados de los estudios de citotoxicidad de metotrexato (MTX) libre y encapsulado en NPs en la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano.

Ponencia 7

Síntesis, caracterización y evaluación de la capacidad antimicrobiana contra staphylococcus aureus de nanopartículas de quitosano cargadas con ampicilina

Yhors Ciro[1*], John Rojas[1,2], Jose Oñate-Garzón[1], Constain Salamanca[1,2]

[1] Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

[2] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

En la actualidad, una estrategia prometedora para combatir microorganismos sensibles y resistentes, disminuyendo las tasas de morbilidad y mortalidad de las infecciones no- nosocomiales es el uso de nanopartículas (NPs) cargadas con antibióticos. Las NPs pueden evitar la degradación de los agentes antimicrobianos y contribuir al aumento de su actividad biológica por diversos mecanismos. También, estas NPs pueden fabricarse con diferentes polímeros, entre los que destaca el quitosano por ser biocompatible, biodegradable, mucoadhesivo y catiónico. En este estudio, se sintetizaron NPs de quitosano cargadas con ampicilina a través de ǵelación iónica y complejación polielectrolítica asistida por ultrasonido de alta intensidad, empleando agentes de entrecruzamiento como ácido fítico y las sales de sodio y potasio de

poli(ácido maleíco-alt-etileno) y poli(ácido maleíco-alt-octadeceno), respectivamente. A las NPs obtenidas se les determinó su tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y eficiencia de encapsulación. Además, su estabilidad física se determinó a temperaturas de 4 °C y 40 °C y su capacidad antimicrobiana se evaluó en tres cepas con diferente grado de resistencia de *Staphylococcus aureus* por el método de micro-dilución en caldo. Las NPs presentaron tamaños <220 nm, potencial zeta positivo, poblaciones monodispersas, a excepción de las NPs producidas con poli(ácido maleíco-alt-octadeceno), y eficiencias de encapsulación de 60% a 70%. Las NPs mostraron adecuada estabilidad física a las condiciones evaluadas, Además, las NPs duplicaron la actividad antimicrobiana de ampicilina, tanto en las bacterias sensibles como resistentes evaluadas. Esto se explica por la disrupción de la homeostasis de la pared celular bacteriana y la interrupción de la ruta de biosíntesis de las proteínas causantes de la resistencia antimicrobiana. Este estudio sirve para demostrar el potencial de las NPs en el tratamiento de infecciones producidas por cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

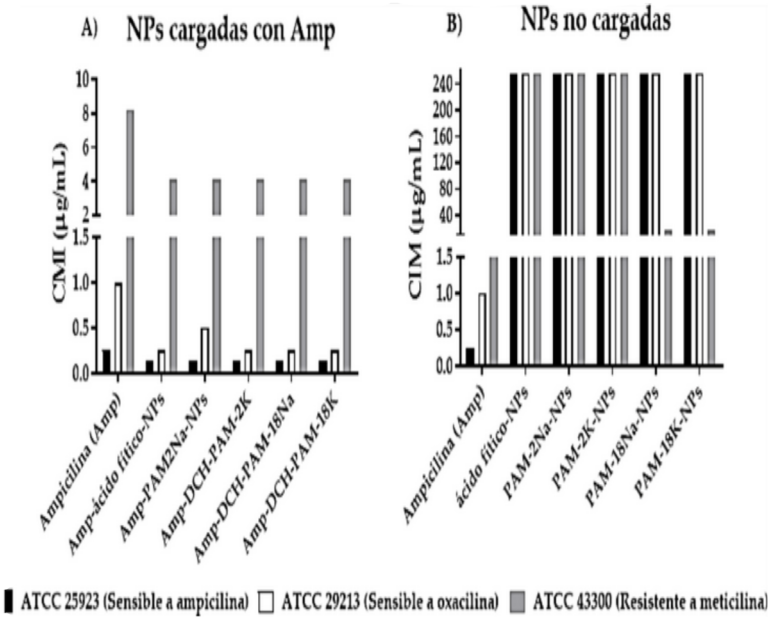


Figura 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las NPs de quitosano con carga y sin carga de ampicilina frente a cepas de S. aureus con diferente grado de resistencia.

Ponencia 8

Desarrollo de una formulación tipo microemulsión conteniendo el extracto etanólico de semillas de *Ambrosia peruviana* con fines a obtener un producto de uso tópico con efecto antiinflamatorio

Carlos Alberto Bernal Rodríguez[1], Luis A. Franco[1], Dorian Jhoel Julio Rodríguez[1]*, María Camila Villamizar Guerrero[1]*, Juan José Carrascal[1]

[1] Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Resumen

Se desarrollará una microemulsión para aplicación tópica que contiene el extracto estandarizado de semillas de *Ambrosia peruviana* (Altamisa), con finalidad de obtener un producto fitoterapéutico antiinflamatorio. Los estudios de preformulación demostraron estabilidad de extracto por 24 semanas en el rango de temperatura de 4 a 25 °C. Adicionalmente, el efecto antiinflamatorio evaluado sobre la producción de óxido nítrico, y la viabilidad celular demostró la excelente actividad del extracto la cual no cambió a la temperatura evaluada. De acuerdo con las propiedades del extracto, experimentalmente se determinó los excipientes a ser utilizados en la microemulsión (aceite, surfactante y cosurfactante). Se obtuvo el rango de concentración de los componentes de la microemulsión, construyendo cinco diagramas de fase pseudoternarios en diferentes proporciones, en porcentaje de peso entre el aceite y la mezcla de Surfactante/ Co-Surfactante, utilizando el método de titulación de fase. El extracto presento una mayor solubilidad en aceite de Coco; paralelamente el surfactante y Co -surfactante ideal para la formulación fueron Tween 80 y Glicerina respectivamente (S:S-Co; proporción 3:1). Mediante un diseño de experimento de mezclas (DDE; D-óptimo) se desarrollaron 13 fórmulas de microemulsión, evaluando como variables repuestas: el tamaño y distribución de gotículas, esparcibilidad y la estabilidad física. La formulación optima de acuerdo con el DOE para la microemulsión será aquella que contenga los valores para las variables siguientes entre 80-140 nm de tamaño y distribución de gotículas; la máxima esparcibilidad y la mejor estabilidad física (estable a separación por centrifuga y a cambios de temperatura)

Ponencia 9

Concentraciones de minerales en lodo hidrotermal de la Costa Caribe, Colombia: análisis de sus posibles usos farmacéuticos

Edgardo José Esquivia Cueter[1]*, Mauro Mauricio Lombana Gómez[2], José Rafael Palacio Angulo[3]

[1] Laboratorios Borge, Barranquilla, Colombia.

[2] Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

[3] Corporación Universitaria Minuto de Dios -Uniminuto, Barranquilla, Colombia.

Resumen

En Colombia se han registrado más de 300 manantiales termales de composición y de características diversas. Según entrevistas semiestructuradas aplicadas en recolección de datos, cada año más de 1000 turistas acuden al termal El Volcán de Costa Verde (Ciénaga- Magdalena), para bañarse en sus aguas de 45 °C y aplicarse el lodo emanado del mismo, al que le confieren propiedades curativas. La presente investigación tuvo por finalidad analizar la concentración de minerales, las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del lodo hidrotermal de la Costa Caribe-Colombia, para determinar su posible uso en medicina y dermocosmética. El muestreo realizado fue por conveniencia, tomando 144 muestras de mayo a noviembre, del año 2022. Las muestras se tomaron en seis partes distintas del pozo termal; el secado de lodos se realizó por un proceso natural con aprovechamiento de la energía solar, luego se le realizo una limpieza por tamiz Mesh 40 para finalmente ser pulverizado, empacado y enviado al laboratorio. El análisis de laboratorio refleja contenidos significativos de P, Ca, Fe, Mn, Zn, B con predominio de S el cual presentó concentraciones muy por encima del resto de los iones analizados. De los resultados se deduce que, por su significativo contenido de minerales y oligoelementos encontrados en su composición, propiedades fisicoquímicas y microbiológicas, el lodo bajo estudio tiene potencial uso medicinal después de tener como base estudios clínicos, toxicológicos y dermatológicos. Con base en lo anterior, se puede inferir que el lodo termal, posee efectos medicinales en su aplicación tópica (en la piel), al tener propiedades antimicrobianas que impiden la aparición de infecciones dérmicas, además de propiedades de reepitelizacion que permiten una rápida cicatrización de las heridas, además de mantener una piel sana. Se recomienda por lo anterior, realizar los subsiguientes

estudios clínicos y terapéuticos con preparaciones tópicas para confirmar las propiedades que indican sus componentes.

Ponencia 10

Contribución a la prevención de la contaminación cruzada de medicamentos mediante la elaboración y estandarización de una Matriz de Validación de Limpieza

Jorge Hernández Guerrero[1*], Rodrigo Aponte Deanz[1], Germán Matiz Melo[1]

[1] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia.

[2] James Brown Pharma, Quito, Ecuador.

Resumen

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo una revisión de la normatividad vigente nacional e internacional y de guías de organizaciones gremiales orientadas al control y la prevención de la contaminación cruzada en ambientes de fabricación farmacéutica (1-13), la cual se centró en la búsqueda y comparación de los criterios para la evaluación de peores casos potenciales, encontrándose que existen diferencias importantes en los enfoques para la determinación del peor caso. Posteriormente, se realizó una valoración de riesgos a los criterios mediante la herramienta de gestión de riesgos denominada Matriz de Análisis de Modos de Fallas y Efectos (FMEA, por sus siglas en inglés) (14); el resultado de esta evaluación develó que la gran mayoría de los criterios se ubicaron en una zona de riesgo alto, otra pequeña porción en la zona de riesgo medio y finalmente un solo criterio, la Exposición Diaria Permitida (PDE, por sus siglas en inglés) (15) se ubicó en la zona de riesgo bajo. Adicionalmente, se calculó el criterio de dificultad de limpieza por dos métodos, calculada y por entrevistas. Finalmente, se elaboraron siete matrices de validación de limpieza para una instalación dedicada a la fabricación de formas farmacéuticas sólidas; seis se construyeron con las fórmulas productivas de medicamentos, variando los criterios para la evaluación del peor caso y una matriz que incluyó los Ingredientes Farmacéuticos Activos para preparar las fórmulas productivas de medicamentos. Se identificó como el peor caso en todas las matrices la formulación LINDAZ y el respectivo el Ingrediente Farmacéutico Activo para preparar la mencionada formulación. Esta información permitió conocer que, al desarrollar las matrices con los criterios seleccionados, la elección del peor caso es la misma; no obstante, es importante que la

matriz presente una capacidad resolutiva adecuada que permita una diferenciación marcada entre las puntuaciones.

Ponencia 11

Comparación de requisitos para la obtención de registros sanitarios de medicamentos y suplementos dietarios en Latinoamérica

Deisy Parra Corzo[1]*, Indira Beatriz Pájaro Bolívar[2], Alberto Herrera Márquez[1]

[1] Laboratorio PROCAPS, Barranquilla, Colombia.

[2] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

La industria farmacéutica es considerada un sector estratégico de la economía mundial, convirtiéndose en objeto de regulación sanitaria, especialmente lo correspondiente a la comercialización de sus productos en distintas nacionalidades. Se realizó un estudio de tipo comparativo de los requisitos en Colombia para la obtención de registros sanitarios de medicamentos de síntesis química y suplementos dietarios frente a 15 países latinoamericanos. Se encontró una regulación claramente definida para medicamentos, siendo las más actualizadas México (Formato Documento Técnico Común) y Uruguay; no tanto para los suplementos dietéticos que en algunos países son regulados como alimentos. Existen diferencias significativas entre las legislaciones vigentes para suplementos dietarios, en las definiciones de "suplemento dietario" vs "medicamento", pasando por países donde no es necesario obtener un registro sanitario para fabricar y comercializar estos productos. En general el grado de armonización de la regulación farmacéutica para obtener registros sanitarios de medicamentos y suplementos dietarios es bajo, especialmente estos últimos. A diferencia de la regulación colombiana de medicamentos, en el resto de los países estudiados no se otorga el registro sanitario bajo distintas modalidades; y requisitos como: información del profesional farmacéutico, estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, y validación de metodologías analíticas, no se exigen en todos los países Latinoamericanos. En cuanto a la regulación de Suplementos dietarios solo Colombia, Perú, Paraguay y los países centroamericanos solicitan certificado de Buenas Prácticas de Manufactura. La regulación de Perú y Ecuador comparte la mayoría de requisitos solicitados en Colombia para estos productos. Finalmente, fue desarrollado un software de consulta de los requisitos para

obtener registros sanitarios de medicamentos y suplementos dietarios en Colombia y Latinoamericana, para que las organizaciones que exportan productos farmacéuticos encuentren de forma ágil la información referente a las exigencias regulatorias particulares, facilitando la búsqueda y estandarizando el proceso de elaboración de dossier para solicitar registros sanitarios.

Ponencia 12

Desarrollo hidrogeles de colágeno para la evaluación in vitro preliminar de la irritabilidad de productos cosméticos. Fase I: estudio de las propiedades mecánicas y reológicas

Ronald Andrés Jiménez Cruz[1,2]*, Daniela Bravo[1], Juliana Garzón[1], Diana Millán[1]

[1] Universidad El Bosque, Bogotá D. C., Colombia.

[2] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

En Colombia, garantizar la seguridad y calidad de los productos cosméticos es sumamente importante ya que son empleados por las personas en su vida cotidiana para mantener su higiene personal, cuidar la salud de la piel y realzar su belleza. La evaluación de la irritación y corrosión de estos productos se realiza de acuerdo con la Directriz de Prueba de la OCDE 404 la cual implica el uso de animales de laboratorio, sin considerar su sufrimiento. En los últimos años, esta práctica se ha convertido en objeto de múltiples reglamentaciones, como la Ley 2047 de 2020 en Colombia y además, en relación con las preocupaciones sobre el bienestar animal, la TG 404 recomienda la aplicación de una estrategia de prueba escalonada que incluye el uso de métodos validados in vitro, los cuales aunque son demorados, costosos y requieren la aplicación de principios fisicoquímicos y fisioanatómicos ya existen comercialmente como Corrositex®, EpiSkinTM Standard Model (SM), EpiDermTM Skin Corrosivity Test, entre otros. Por lo tanto, en este trabajo, se desarrollaron hidrogeles de colágeno tipo I nativos no citotóxicos para fibroblastos humanos y con propiedades mecánicas (módulos de elasticidad) y viscoelásticas (módulos de almacenamiento y perdida de energía) similares a los de la dermis humana. En estos hidrogeles se evaluó el efecto de tres agentes irritantes (aceite esencial de árbol de té, bencilo benzoato y propilparabeno) presentes en productos cosméticos sobre las propiedades mecánicas

y reológicas de los hidrogeles. Se observo una disminución significativa en las propiedades reológicas y mecánicas de los hidrogeles posterior a la exposición de cada uno de los agentes irritantes, comportamiento característico al proceso de envejecimiento de la piel comparadas con los resultados del grupo control. Estos resultados indican que la evaluación de las propiedades mecánicas y reológicas de los hidrogeles de colágeno I pueden ser empleados como una alternativa económica, rápida y sencilla para la evaluación preliminar de la seguridad de productos cosméticos.

Ponencia 13

Desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost

Ronald Andrés Jiménez Cruz[1]*, Mónica Daniela Fernández[1]

[1] Universidad El Bosque, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

El glaucoma representa un gran impacto a nivel mundial, ya que, es considerado como la segunda causa de ceguera en el mundo. El desarrollo de alternativas que brinden una mejor calidad de vida ha sido uno de los propósitos más importantes en el campo de las ciencias farmacéuticas. Los nanogeles debido a su alto contenido de agua y tamaño nanométrico son una alternativa adecuada para la administración ocular. En este trabajo se diseñó un prototipo de nanogel a base de polímeros naturales como la gelatina mediante el método de preparación sol-gel para la administración controlada de Latanoprost a nivel ocular. Este método permitió obtener nanogeles con un rango nanométrico entre 225 a 874 nm, un rendimiento entre 16-30%, una capacidad de hinchamiento entre 22-46 % y una eficiencia de carga máxima del 57 %. Adicionalmente, se demostró que estos sistemas muestran una liberación controlada con una cinética de liberación de Korsmeyer Peppas e Higuchi. Finalmente, las pruebas realizadas para la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas evidencian que estructuralmente no se presentaron cambios tras la incorporación del Latanoprost al sistema, además de que las propiedades reológicas muestran el comportamiento viscoelástico con flujo pseudoplástico recomendable para lograr una residencia controlada en la conjuntiva y esclerótica del ojo. Adicionalmente los nanogeles obtenidos no fueron citotóxicos para fibroblastos humanos y no generaron hemolisis. Los resultados obtenidos indican que los nanogeles con Latanoprost son una alternativa en el tratamiento del glaucoma.

Ponencia 14

Experiencia de fortalecimiento de cadenas productivas agrícolas para la producción de materia prima de origen natural

Andrés Pareja López[1], Elizabeth Cadavid Torres[1*]

[1] Universidad CES, Medellín, Colombia.

Resumen

Colombia a pesar de ser el segundo país con mayor biodiversidad no es líder en la producción de materias primas de origen natural con calidad para la industria farmacéutica. En el acompañamiento a las cadenas productivas del propóleo y asaí, se han detectado varias razones por las que hay baja disponibilidad de materia prima nacional: falta de conocimientos de los parámetros de calidad, falta de conocimiento de la normatividad nacional e internacional, y baja articulación entre la industria farmacéutica y la agrícola. La Universidad CES ha aportado a la solución de estas falencias, mediante un programa que consta de tres componentes: educación en BPA y calidad, asesoría técnica en la definición de parámetros de calidad, prestación del servicio técnico para la evaluación de la seguridad del ingrediente y desarrollo de prototipos de productos. Como parte de los resultados de apoyo a las cadenas productivas, en la cadena de propóleos se dio capacitación a más de 50 personas para la implementación de procesos estandarizados que permitieran obtener una matriz más homogénea. Además, se les ayudo a establecer parámetros de calidad según el propósito de aplicación de sus propóleos. Con la cadena productiva del asaí, la fortalecimos mediante asesorías técnicas en la etapa de definición de parámetros de fisicoquímicos y en la formulación de una propuesta de trasformación de la matriz para generar un ingrediente apto para ser incorporado en producto nutracéutico o cosmético. En general, el apoyo a estas cadenas productivas nos ha dejado una experiencia de la interdisciplinariedad, no solamente vista desde la interacción de profesionales, sino a través de la interacción con agricultores, emprendedores y empresarios, permitiendo una mirada integral del proceso productivo de materias agrícolas de origen natural.

Poster 1

Desarrollo de un sistema de liberación controlada de 5-fluorouracilo en el colon basado en nanocelulosa bacteriana para administración oral

Estefanía Martínez-Correa[1]*, Cristina I. Castro[1], Marlon A. Osorio[1], Yesid Vélez[1]

[1] Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Resumen

El 5-fluorouracilo es el quimioterapéutico más usado para el tratamiento del cáncer colorrectal, aunque solo el 1% del principio activo alcanza el colon cuando se administra por vía intravenosa. En el presente trabajo se evaluó el potencial uso de la nanocelulosa bacteriana (NCB) como plataforma para la administración oral y la liberación controlada del medicamento. Primero, se evaluó el fenómeno de adsorción del 5-fluorouracilo sobre la NCB, y luego se encapsuló por secado por aspersión. Las cápsulas se caracterizaron morfológica y químicamente. Finalmente, se evaluó el perfil de liberación del medicamento en fluidos simulados de estómago y colon, y se determinó la efectividad del sistema en la inhibición de dos líneas celulares de cáncer de colon. Se encontró que la NCB tiene una buena interacción con el 5-fluorouracilo a 25 °C, formando una monocapa sobre la superficie de las nanocintas de NCB. También, se evidenció que el secado por aspersión formó partículas nanoestructuradas de NCB, en las cuales se comprobó la presencia del 5-fluorouracilo. Se encontró que las nanocápsulas liberan el 40% del medicamento en el estómago, por lo que se recubrieron con Eudragit S100® que protegió exitosamente el fármaco. En colon se liberó el 5-fluorouracilo durante 24 horas, y se aumentó el efecto de inhibición celular del fármaco debido a su liberación controlada.

Poster 2

Elaboración de un bioadsorbente modificado a partir de los exoesqueletos de camarón para la descontaminación de aguas residuales

Cesar Londoño[1]*, John Jairo Rojas[1]

[1] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

El agua es el compuesto más importante para la vida en la tierra, cerca del 1% es potable y esta cifra se ha reducido drásticamente debido a la presencia de contaminantes emergentes (CE) entre ellos los fármacos. Estos compuestos se encuentran en las aguas residuales y generan un serio problema de salud pública debido a sus efectos negativos sobre el ser humano y el medio ambiente. Por esta razón, como alternativa de los métodos de descontaminación tradicionales se desarrollaron diferentes bioadsorbentes modificados a partir de los exoesqueletos de camarón (EE): (CAR,CA1:3A,CA1:3B,CAM,CA1:3U) y se compararon frente al carbón activado comercial (CAC) (Figura1). Posteriormente, para cada material se realizó el estudio de remoción de 8 fármacos con alto consumo en Colombia y se caracterizaron (Tabla1) para finalmente realizar el análisis estadístico y los estudios de cinéticas e isotermas de adsorción. Los resultados mostraron alta remoción >90% con CAC, seguido por CAM-CA1:3U para la mayoría de los fármacos, excepto para la metformina debido a la ausencia de grupos funcionales que permiten una interacción con el adsorbente. Los grupos ácidos y fosfato impartieron una carga negativa en la superficie del material; esto permite unirse a contaminantes catiónicos mediante interacciones electrostáticas, lo que explica el alto porcentaje de adsorción de verapamilo (Figura 2). Aunque los materiales CAM-CA1:3U mostraron un área superficial baja, estos presentaron una buena capacidad de remoción especialmente para fármacos como verapamilo, ampicilina y amlodipino (Figura3). Este estudio permitió comprobar que la modificación de los EE puede mejorar su capacidad para adsorber fármacos, convirtiéndolos en una buena alternativa para la descontaminación de aguas residuales gracias a su bajo costo económico y a sus procesos amigables con el medio ambiente. Todo esto con el fin de reducir el impacto ambiental y generar una posible alternativa en situaciones clínicas en caso de intoxicación.

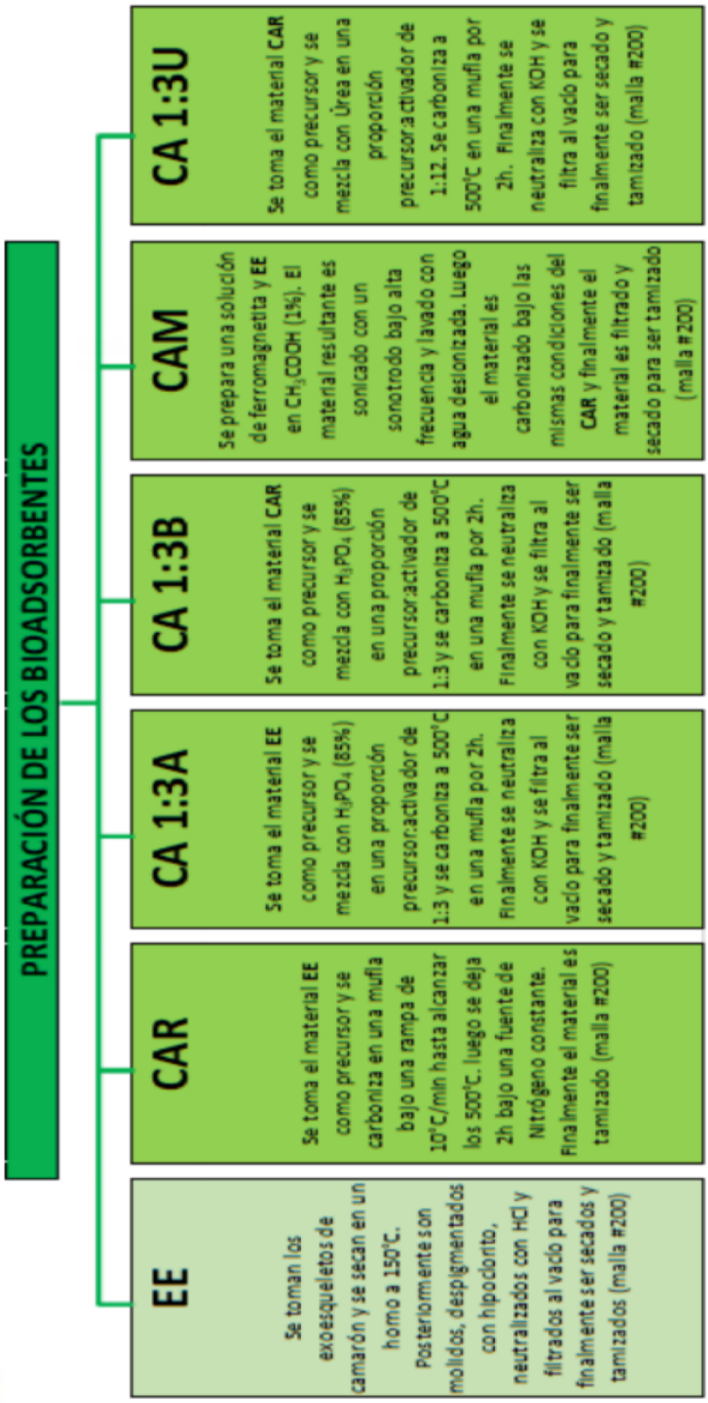


Figura 1. Metodologías para la Preparación de los Bioadsorbentes

Tabla 1. Caracterización Fisicoquímica de los Bioadsorbentes

Material	Titulación Boehm (umol/g)					Valores	Área Superficial	Volúmen Real
	Acidez Total	Fenoles	Lactonas	Grupos ácidos	Basicidad Total	PZC	(m^2/g)	(cm^3/g)
EE	3960	3960	0	0	5850	2,50	10,22	0,55
CAR	2040	2040	0	0	9350	2,00	36,31	0,37
CAC	4320	4320	0	0	950	3,75	460,15	0,62
CA 1:3A	4200	4200	0	0	0	0,80	11,40	0,35
CA 1:3B	4880	4880	0	0	0	1,10	11,38	0,40
CAM	9120	2370	0	6750	9820	2,30	20,18	0,52
CA1:3U	10610	3880	0	6730	9970	2,35	22,91	0,39
EE U	10490	3770	0	6720	9905	2,40	12,02	0,72

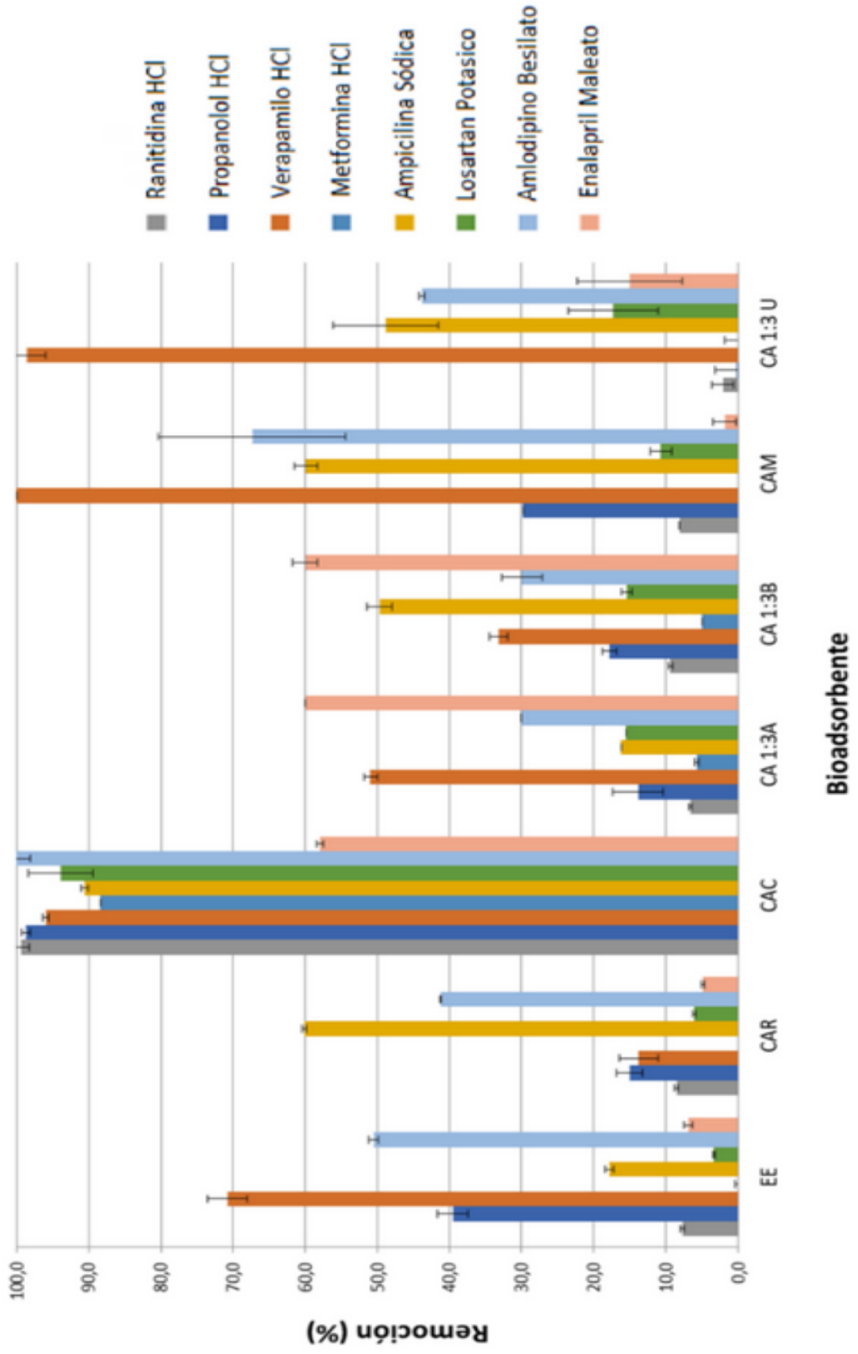


Figura 2. Capacidad de Remoción de los Bioadsorbentes

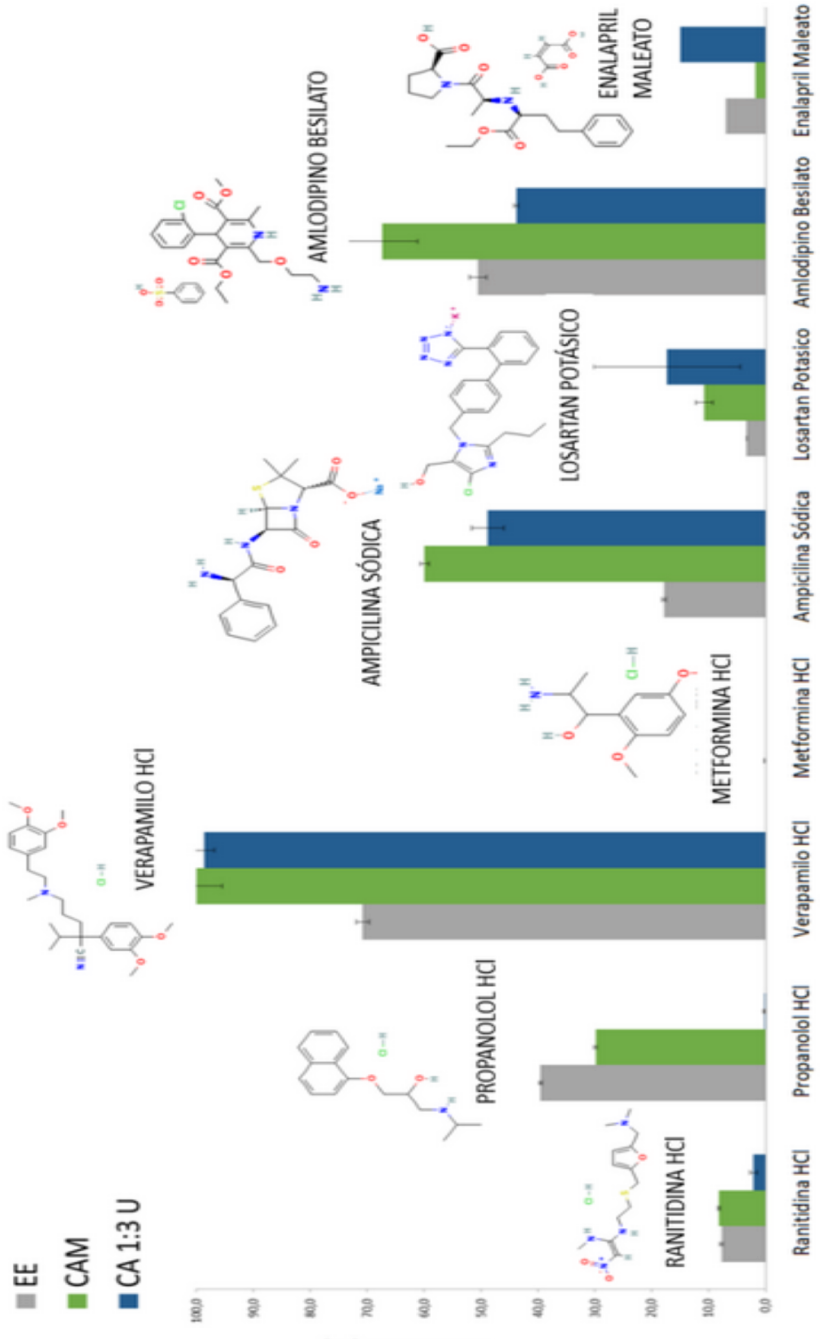


Figura 3. Gráfico de Efectos Medios de Remoción (mejores bioadsorbentes)

Poster 3

Plasma rico en plaquetas utilizado como tratamiento en pacientes con acné

David Hernández Hernández[1]*, Daniel de Luna Amaro[1], Ma de Lourdes De la Rosa Hernández[1], Julian Perez Ruiz Esparza[1], Karen Mariana Castro Correa[1], Ma Argelia López Luna[1]

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

Resumen

Se realizó un estudio observacional descriptivo de n= 5 pacientes se les tomó la muestra en tubo de ACD, se centrifugó a 3500 rpm durante 7 min, posteriormente se agregó 0,3 ml de gluconato de calcio al 10 % en una jeringa de 3 cm donde se colocó el plasma rico en plaquetas, se realizó la asepsia correspondiente al paciente y se aplicó el PRP de manera subdérmica con aguja de 30 G, el tratamiento se aplicó cada 7 días, la sesiones fueron personalizadas. Los resultados se observaron a los7 días en la primera sesión, lo primero que desaparece es el enrojecimiento que se presenta por el proceso inflamatorio que de la ulceración, a los 7 días posteriores de la segunda sesión se presenta un proceso de desinflamación de las lesiones, la elasticidad de la piel al inducir neocolagenogénesis en los fibroblastos, la piel comienza a observarse con mejor textura y mayor luminosidad, en las sesiones posteriores comienza la recuperación de la dermis sin aparición de nuevas lesiones.

Poster 4

el Laboratorio Extendido una Opción para el Aprendizaje Práctico en los Estudiantes de Química Farmacéutica

Viviana Ramos Rueda[1]

[1] Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.), Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

Durante la pandemia por COVID 19 los laboratorios extendidos se convirtieron en una alternativa para remplazar actividades presenciales como las prácticas de laboratorio. **Objetivo:** Determinar la percepción de los estudiantes sobre la aplicabilidad de los laboratorios virtual como una alternativa de los tipos de laboratorios extendidos, en el aprendizaje práctico de Biotecnología Farmacéutica. **Metodología:** Se aplicó una encuesta con variables relacionadas sobre ventajas y desventajas del uso de la plataforma labxchange a los estudiantes de octavo semestre que hacen parte del curso de Biotecnología Farmacéutica en segundo semestre del año 2021. **Resultados:** El 87% de los estudiantes creen que el trabajo en el laboratorio virtual fue relevante para sus conocimientos en este curso, consideran que le permite la aplicación de los cocimientos teóricos en la práctica, sin necesidad de tener un laboratorio presencial. La mayoría expresaron que a pesar de las ventajas que esto representan no pueden reemplazar la experiencia del laboratorio presencial. **Conclusión:** Dentro de los laboratorios extendidos, la mejor opción de un acercamiento del estudiante a la práctica real la ofrece los laboratorios remotos; Sin embargo, la disponibilidad de estas plataformas es limitadas para la enseñanza práctica de biotecnología.

Poster 5

Medicamentos biosimilares en Colombia: análisis retrospectivo de aspectos regulatorios, técnicos y de consumo

Velky Ahumada[1]*, Gisell Mercado[2], Juan Ricardo Urrego[2]

[1] Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena, Colombia.

[2] Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Resumen

En Colombia el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) establece los requisitos y procedimientos que garanticen la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos biosimilares. El objetivo de este trabajo fue analizar el panorama general de los biosimilares oncológicos aprobados hasta la fecha en Colombia, teniendo en cuenta los requisitos de calidad, seguridad y eficacia exigidos por la autoridad sanitaria colombiana, a través de los cuales el país da luz verde a su ingreso por la ruta de comparabilidad. Metodología: Se recopiló información de las Bases de Datos del INVIMA para establecer cuántos medicamentos biosimilares oncológicos han sido aprobados por la ruta de comparabilidad completa o abreviada. **Resultados:** A fecha de corte de octubre de 2022, en Colombia se han aprobado doce biosimilares. Once de ellos ingresaron por la ruta de comparabilidad completa, y uno de ellos por comparabilidad abreviada. El 66,67% de los biosimilares aprobados corresponden al grupo de medicamentos antineoplásicos, tipo anticuerpo monoclonal. **Conclusiones:** Los altos costes de los medicamentos oncológicos suponen un desafío para el sistema de salud colombiano. Aunque la presión económica para adoptar biosimilares es alta, la autorización de la comercialización de estos medicamentos se basa en evidencia científica. Todos los oncológicos que han sido aprobados por el INVIMA hasta la fecha en Colombia ingresaron bajo la ruta de comparabilidad completa.

Poster 6

Desarrollo de una formulación antiinflamatoria y antiséptica de uso tópico, con base en un extracto estandarizado de *Cordia alba* y aceites esenciales

Marcel Berrio Medina[1*], Germán Eduardo Matiz Melo[1], Luis Alberto Franco Ospina[2], Jenny Paola Castro Guerrero[3]

[1] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia.

[2] Universidad de Cartagena, Colombia.

[3] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

Este trabajo busca desarrollar una forma farmacéutica tópica tipo nanoemulsión que incluya un extracto estandarizado de flores de *Cordia alba* y los aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata* T y *Cinnamomum verum* J. PRESL, coadyuvante en el tratamiento del acné. Se llevó a cabo la recolección de las flores maduras de *C. alba*, las cuales fueron, lavadas, secadas, molidas y sometidas a extracción por maceración con etanol al 96%. Se realizó el cribado fitoquímico, en el cual se determinó la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides entre otros. La evaluación microbiológica del extracto de *C. alba* y los aceites esenciales se llevó a cabo siguiendo el método de microdilución en caldo, preparando una suspensión bacteriana (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. acnes*). La DO620 se determinó después del período de incubación y la proliferación bacteriana se estimó de acuerdo con el control de crecimiento máximo. La IC50 se determinó cuando el extracto inhibió más del 50% del crecimiento bacteriano. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el modelo in vivo de edema auricular inducido por TPA, cuantificando el porcentaje de inhibición y determinando la actividad de la enzima MPO como indicador de la infiltración de neutrófilos al tejido. Adicionalmente se realizó la evaluación histopatológica del tejido identificando el edema, hiperplasia/hipertrofia, infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares. Adicionalmente, se evaluó el efecto antiinflamatorio in vitro cuantificando los niveles de los mediadores inflamatorios NO, IL-1β, IL-6, TNF-α, y PGE2 en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS. Los resultados muestran que el extracto etanólico de *C. alba* tiene actividad antibacteriana y antiinflamatoria, convirtiéndolo en promisorio para tratar el acné en la formulación a desarrollar.

Poster 7

Actividad anti-proliferativa de 10 extractos obtenidos de plantas medicinales de la costa caribe colombiana

Daneiva del Carmen Caro Fuentes[1,2], Andrés Felipe Franco Montoya[1*], Yuranis Macea Medina[2], Laura Cristina Ospina Mateus[1], Jenny Paola Castro Guerrero[1,2], Fredyc Díaz Castillo[1], Rubén Salas Díaz[1], Luis Alberto Franco Ospina[1]

[1] Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

[2] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

El cáncer es un grave problema mundial de salud pública que fue responsable de 9'958.133 millones de muertes en 2020. Si bien se dispone de un manejo farmacológico, sus efectos secundarios y elevado costo, impactan negativamente en la calidad de vida de las pacientes. Colombia es un país con elevada biodiversidad y su flora se ha utilizado tradicionalmente para tratar enfermedades, incluido el cáncer. En este estudio, exploramos el efecto antiproliferativo de 10 extractos etanólicos totales de plantas de la medicina tradicional del Caribe Colombiano, contra células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer cérvico-uterino (HeLa), utilizando el método de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Los resultados mostraron que 3 de los 10 extractos evaluados fueron capaces de afectar el crecimiento de ambas líneas celulares en estudio, a concentraciones menores a 100 µg/mL, siendo el extracto de B. simaruba el que mostró el mejor espectro de acción antiproliferativa. En conclusión, los resultados de este estudio permitieron identificar extractos de plantas medicinales de la Costa Caribe Colombiana que representan una valiosa fuente de metabolitos con actividad frente a células de tumorales; con especial énfasis en el extracto y las fracciones de *B. simaruba*, que exhiben una destacada actividad anti-proliferativa.

Poster 8

Actividad antiproliferativa de doce frutas utilizadas en la dieta colombiana

Jenny Paola Castro Guerrero[1,2], Yuranis Macea Medina[1*], Andrés Felipe Franco Montoya[1], Daneiva Caro Fuentes[1,2], Rubén Salas Díaz[1], Luis Alberto Franco Ospina[1]

[1] Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

[2] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

El cáncer se encuentra como la primera y segunda causa de mortalidad a nivel mundial, siendo el de pulmón el más diagnosticado tanto en hombres y mujeres, con creciente incidencia y elevadas tasas de morbilidad-mortalidad, por lo que este tipo de cáncer es objeto de mucha investigación. Aunque existen terapias definidas que alivian signos y síntomas de la enfermedad, la reacción que pueda tener cada paciente hacia su aplicación es incierta y, en ocasiones, no funciona o hay recidivas que afectan negativamente la calidad de vida del paciente. Estos factores han conducido a la población que padece la enfermedad a buscar alternativas con menores efectos, siendo los productos naturales la primera y más atractiva opción. Colombia es uno de los países con la mayor variedad de frutas del mundo. Su diversidad geográfica le permite contar con variedad de climas y tipos de suelos. Algunas especies frutales que crecen en nuestro país tienen el potencial para ser proveedoras de metabolitos potencialmente útiles para prevenir la aparición o progresión de enfermedades crónicas no transmisibles, como el cáncer, o podrían ser de utilidad como coadyuvantes en el tratamiento de estas patologías. En este trabajo evaluamos la actividad anti-proliferativa *in vitro* de 12 extractos obtenidos de las pulpas de frutas cultivadas en Colombia y ampliamente utilizadas en nuestra dieta, frente a la línea celular de cáncer de pulmón A549, con miras a identificar fuentes naturales de compuestos útiles como coadyuvantes en el tratamiento de este cáncer. La actividad anti-proliferativa fue evaluada empleando el método de reducción de MTT. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron identificar 2 extractos con promisoria actividad anti-proliferativa: Guanábana (*Annona muricata* L) y Chirimoya (*Annona reticulata* L), los cuales fueron capaces de disminuir la viabilidad de las células A549 en más de un 90%.

Poster 9

Impacto del diseño y desarrollo en un medicamento para el sistema nervioso central previo a estudios de bioequivalencia *in vivo*

Linda Astrid Abadía[1]*, Alba Lucía Valenzuela[1]

[1] Laboratorios Legrand, Bogotá D. C., Colombia.

Resumen

La mayoría de los fármacos empleados para el sistema nervioso central requieren estudios de bioequivalencia In vivo y rara vez aplica en ellos el principio de bioexención, así tengan un sistema de clasificación biofarmacéutica aceptado para tal fin. Esto obedece a que muchos de estos poseen farmacocinéticas no lineales, algunos con tiempos de vida media muy inciertos y amplios o con ambivalencias por su comportamiento en pH determinados dada la naturaleza de su pKa y de otras de sus propiedades físicas, tanto del IFA (Ingrediente farmacéutico activo) como de la forma farmacéutica elegida. En el presente trabajo, mostramos por medio de un medicamento común que se emplea para trastornos del sistema nervioso central, cómo el diseño y desarrollo influye de manera notable en el perfil de disolución y con ello en los perfiles comparativos frente a su medicamento de referencia, los cuales sirven como punto de partida para avanzar hacia los estudios de bioequivalencia In vivo. Fueron evaluados diferentes aspectos determinados de los atributos críticos de producto como la valoración, impurezas y disolución; adición y tipo de auxiliares de formulación, porcentaje de fármaco en la forma farmacéutica (tabletas) y algunos parámetros críticos de proceso derivados de su método de manufactura y de estos especialmente la influencia del tipo de recubrimiento a emplear, concluyendo que este último fue el factor determinante y límite en la obtención de perfiles comparativos de disolución entre el producto multifuente y el medicamento de referencia. Con este trabajo se concluye que la importancia de emplear un proceso de calidad por diseño en medicamentos que requieren demostrar bioequivalencia estrictamente de manera *in vivo* puede ayudar a direccionar la exitosa obtención de productos genéricos.

Poster 10

Evaluación de la eficacia y seguridad de las vacunas frente al covid 19 en trabajadores del puerto de la ciudad de cartagena postpandemia

Antistio Anibal Alviz Amadora[1]*, Laura Melissa Bárcenas Díaz[1], Valeria Nicolle Palacios Carmona[1], Lina Marcela Orozco Campo[1], Liliam Ester Gomez[2]

[1] Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

[2] Grupo Puerto de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Resumen

Introducción: La pandemia ocasionada por el COVID-19 genero un gran impacto sanitario, político, social y económico a nivel mundial lo que llevo a la ciencia a crear diferentes vacunas contra el SARS- CoV-2, una vez listas estas vacunas fueron aprobadas por el Ministerio de salud colombiana y se inició un programa de vacunación masiva en el país, sin embargo, existen pocos estudios donde se evalúa la seguridad y eficacia de las vacunas. **Metodología:** El tipo de estudio fue descriptivo cuantitativo, donde se seleccionaron 121 trabajadores del puerto de Cartagena, se clasificaron según el tipo de vacuna administrada y se determinaron anticuerpos contra SARS-CoV2 después de recibir el esquema de vacunación completo. **Resultados:** Del total de los pacientes el 44,1% de ellos fue vacunado con Pfizer, 34,6% con Sinovac, 17,4% con Jansen y 3,9% con moderna. En función de la presencia de anticuerpos IgG específicos contra el SARS-CoV-2 se obtuvo que el (95,2%) de los participantes presentaban dichos anticuerpos y que el (4,8%) no presentaban dichos anticuerpos. **Conclusión:** Con estos datos, se pudo evidenciar que la vacuna ofrece protección en la mayoría de los pacientes evaluados con un perfil de seguridad bueno durante el tiempo de observación del efecto.

Poster 11

Información y comercialización de medicamentos y productos naturales en internet y redes sociales

Edwin Jair Osorio Bedoya[1]*, Lina María Salazar Zuluaga[1], Yuliet Ramírez Agudelo[1]

[1] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

Uno de los cambios que ha traído consigo el internet, es la aparición y desarrollo de las redes sociales que se han incorporado al día a día de las personas. Las redes sociales ofrecen muchas herramientas para interaccionar entre usuarios, lo que las convierte en un medio social dinámico e interactivo. Estos cambios también han afectado a la forma en la que la población accede y comparte información sobre la salud y la enfermedad. En la actualidad, la adquisición de información médica vía internet es cada vez más común, siendo ya el recurso más habitual para la búsqueda de medicamentos y consejos médicos. **Objetivo:** Identificar la información que se puede encontrar en internet y redes sociales sobre medicamentos, cuidados o remedios naturales, que pueden conllevar a la automedicación o mala información. **Metodología:** Se realizó una búsqueda en redes sociales: Instagram y Facebook, usando los hashtag: #medicamentos, #productosnaturales y #automedicación, para validar cuales eran las publicaciones que informan sobre estos temas de salud. **Resultados:** En Instagram usando el hashtag #medicamentos se encontraron 1,4 millones de publicaciones, y en Facebook 1,1 millones. Además, con el hashtag #productosnaturales se encontraron 1,9 millones de publicaciones en Instagram y 2,5 millones en Facebook. Por su parte, usando el hashtag #automedicación se encontraron más de 5000 publicaciones en Instagram y Facebook. Los contenidos de las publicaciones encontradas son muy variados, que van desde comercialización y publicidad de productos farmacéuticos, hasta recomendaciones de medicamentos y otras prácticas inapropiadas del cuidado de la salud, por parte de influenciadores que cuentan con muchísimos seguidores. **Conclusión:** En las redes sociales podemos encontrar mucha información sobre salud, incluyendo medicamentos y productos naturales. En muchos casos, tratan de educar a las personas sobre el uso correcto y racional, pero, también dan demasiada información sobre sus usos, lo cual puede ser usado para favorecer la automedicación o hasta la autoprescripción.

Poster 12

Identificación de productos farmacéuticos a base de cannabis comercializados en Colombia. Riesgos potenciales de seguridad para el paciente

Edwin Jair Osorio Bedoya[1]*, Lina María Salazar Zuluaga[1], Paulina Peláez Mesa[1]

[1] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

En Colombia existe un gran potencial de desarrollo de la industria del cannabis con fines medicinales, y cada vez se encuentra mayor disponibilidad de evidencia científica que respalda su uso para diferentes patologías. **Objetivo:** Identificar los productos farmacéuticos a base de cannabis que están aprobados para ser comercializados en Colombia. **Metodología:** Mediante una revisión en el sitio web del Invima se identificaron los productos farmacéuticos a base de cannabis que están aprobados para ser comercializados en Colombia. Posteriormente, se hizo una revisión de redes sociales como: Instagram y Facebook, para identificar los productos farmacéuticos a base de cannabis que se comercializan por este tipo de canales. Además, se hizo la búsqueda de registros sanitarios y/o permisos de comercialización de estos productos. **Resultados:** Se logró identificar los productos farmacéuticos a base de cannabis que están aprobados en Colombia. Se encontraron 5 registros sanitarios vigentes, que corresponde a cuatro presentaciones de Cannabidiol (CBD) y uno de Delta-8 tetrahidrocannabinol (THC). Por otro lado, se encontró 12 registros sanitarios de medicamentos homeopáticos y 202 cosméticos, de los cuáles, 12 están suspendidos y 2 vencidos. En redes sociales los resultados fueron: Instagram 28 productos con CBD, y en Facebook 75 productos que no fue posible establecerles la categoría, sin embargo, once cumplían con tener el registro sanitario como cosméticos. **Conclusión:** Se identificaron productos farmacéuticos a base de cannabis que están aprobados para ser comercializados en Colombia. De éstos, los productos cosméticos son a los que más registros sanitarios ha otorgado el Invima. Sin embargo, se considera que hay limitaciones en la búsqueda en las redes sociales, para establecer más precisamente la cantidad de este tipo de productos comercializados en Colombia, tanto de manera legal, como fraudulenta. En este sentido, no hay certeza del perfil de seguridad y efectividad de estos productos comercializados a través de redes sociales.

Poster 13

Diseño y desarrollo de una matriz hidrofóbica como forma de liberación modificada para ibuprofeno

Indira Beatriz Pájaro Bolívar[1]*, Gina Paola Domínguez Moré[1], Gina Paola Pertuz Martínez[1], Daniela María Álvarez Gutiérrez[1], Alberto Enrique Herrera Márquez[1]

[1] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

En el mercado se encuentran numerosas formas farmacéuticas de liberación convencional para administración oral, que entregan el principio activo (PA) en forma inmediata, pero que poseen algunas limitaciones al no permitir establecer un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempo, por esta razón, en la industria farmacéutica se ha despertado un gran interés por el desarrollo de formulaciones, que contengan matrices donde el PA se encuentre uniformemente disperso y logre una liberación modificada. El presente estudio se centró en el diseño y formulación de sistema matriciales basados en dióxido de silicio coloidal para la liberación modificada de ibuprofeno. Se evaluó la compatibilidad de los materiales por comparación de los espectros IR PA-excipiente individuales y en mezclas binarias, sin observar solapamientos entre bandas. Se elaboraron cápsulas con 200 mg de ibuprofeno y sílicas en diferentes proporciones, finalmente se evaluó la liberación del PA en perfiles de disolución utilizando como medio de disolución Buffer fosfato dihidrógeno de sodio con dodecilsulfato sódico al 2%, aparato 1 canastilla, y cuantificación espectrofotométrica. Se demostró que las matrices desarrolladas modifican la liberación de ibuprofeno, siendo la disolución más lenta en la formulación con mayor concentración de sílica, logrando extender la velocidad de liberación del PA durante 12 horas. Estos resultados aportan información útil para futuras investigaciones sobre la aplicación de este tipo de excipientes en el desarrollo de sistemas orales de liberación modificada de manera que se pueda mantener o mejorar su estabilidad, biodisponibilidad y/o aceptación por parte del paciente.

Poster 14

Acercamiento al panorama de la inclusión de personas con discapacidad en la industria farmacéutica de la región caribe colombiana

Eduardo Andrés Marino Cáñamo[1*], Gina Paola Domínguez Moré[1], Indira Beatriz Pájaro Bolívar[1]

[1] Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Resumen

Promover la inclusión en sus distintas dimensiones, es una de las metas de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, siendo las personas con discapacidad (PcD) uno de los grupos vulnerables en esta materia. Aunque en Colombia se han hecho esfuerzos en la promoción de políticas públicas para la protección de derechos de PcD, indicadores del Ministerio de Salud y Protección Social y del sector privado, evidencian limitaciones persistentes en cuanto al acceso a educación y empleo de esta población. Teniendo en cuenta que multinacionales farmacéuticas en Europa y Latinoamérica han dado ejemplos exitosos de inclusión de PcD dentro de sus acciones de responsabilidad social empresarial (RSE), se planteó esta investigación para explorar la situación en este aspecto de la industria farmacéutica en la Región Caribe colombiana. Se realizó una encuesta en las divisiones encargadas de la gestión humana de tres organizaciones farmacéuticas de la Región Caribe, con la cual se indagó sobre las características, ocupación, desempeño, facilidades y barreras de acceso de las PcD. Se identificó que las cifras de vinculación de PcD son bajas (0 a 0.3% de los empleados), en parte porque no participan en los procesos de selección. Las PcD vinculadas corresponden a hombres y mujeres entre 18 y 59 años, que presentan principalmente dificultad locomotora. El nivel máximo de formación entre éstas es el universitario, ocupan puestos operativos o administrativos en las compañías, con permanencia mayor a 3 años y excelente desempeño laboral. Solo una de las empresas participantes ha realizado acciones que facilitan la inclusión, mientras que las principales barreras detectadas fueron físicas y de conocimiento. Es necesario sensibilizar a las empresas del sector farmacéutico de la Región Caribe sobre la implementación de estrategias para promover y garantizar la inclusión de PcD, como parte de sus políticas de RSE.

Poster 15

Evaluación de la capacidad estabilizante de almidones modificados en emulsiones tipo O/W, constituidas por aceites de nuez o de Sacha Inchi y agua, como estrategia novedosa para el diseño de productos farmacéuticos

Carolina P. Mora[1]*, Laura Rodríguez-Murcia[1], Andrés C. Arana-Linares[1], Isabella Perdomo[1], Isabela Valencia[1], Oscar Ramírez[1], Katherine Suarez[1], Anderson Luna[1]

[1] Universidad ICESI, Cali, Colombia.

En el sector farmacéutico las emulsiones permiten el transporte de diferentes principios activos para ser liberados en el organismo. Dichos sistemas están conformados por dos fases inmiscibles, una acuosa y otra oleosa, una de las cuales se dispersa uniformemente en la otra en forma de gotículas, empleando para ello equipos que aplican alta fuerza de corte. Para su estabilización requieren la adición de agentes emulsificantes, siendo los tensioactivos los más utilizados; sin embargo, en particular para los tensioactivos aniónicos se han reportados efectos indeseables en la piel, por la interacción que tienen con el medio biológico del sitio de aplicación. En este contexto, surge el interés de investigar alternativas de emulsificación como es el uso de almidones modificados hidrofóbicamente, con el fin de reducir la cantidad de tensioactivos empleada en la formulación. En adición, los aceites de nuez y de Sacha Inchi posibilitan la vehiculización de fármacos y por sus propiedades hidratantes y antioxidantes pueden contribuir al diseño de productos farmacéuticos. Por lo anterior, el presente estudio tiene como propósito evaluar la capacidad emulsificante de cuatro referencias comerciales de almidón modificado con OSA: N-Creamer® 46, Purity Gum® Ultra, Capsul® y Purity Gum® 2000, en emulsiones constituidas por aceites de nuez o de Sacha Inchi y agua, a través de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones acuosas de los biopolímeros y de las emulsiones evaluadas bajo condiciones de estrés térmico para su potencial uso en formulaciones farmacéuticas.

El incremento en la concentración del almidón modificado en las dispersiones acuosas reduce la tensión superficial (γ) y la tensión interfacial ($\gamma L/L$), y aumenta la viscosidad de la fase acuosa, contribuyendo a la estabilidad de los sistemas emulsificados por la formación de una película de las cadenas poliméricas del almidón alrededor de las gotas de aceite, inmovilizándolas e impidiendo su acercamiento. En adición, el grado de sustitución (DS) y la masa molecular (Mw) de los almidones influyen en su capacidad para reducir la γ y la $\gamma L/L$, por lo que Purity Gum® 2000 y Capsul® disminuyen en una mayor magnitud estos parámetros que Purity Gum® Ultra y N-Creamer® 46. La

Mw del almidón hidrofóbico influye en la densidad de las dispersiones acuosas, que es superior a concentraciones más altas del biopolímero. En cuanto al pH de las dispersiones acuosas, este parámetro disminuye al aumentar la concentración de almidón modificado debido a su carácter moderadamente ácido, generado por las condiciones empleadas en el proceso de producción de los almidones tratados con OSA.

Los resultados del estudio de estabilidad de las emulsiones relacionados con el índice de cremado, el tamaño y la distribución del tamaño de gota, el potencial ζ y el pH de los sistemas emulsificados evidencian que aquellos preparados con N-Creamer 46® (especialmente al 20 % p/p) conservan las características iniciales de las emulsiones elaboradas con los aceites de nuez o de Sacha Inchi, debido a que este almidón exhibe una mayor Mw, lo que le permite formar una capa más gruesa del biopolímero en la interfase agua/aceite. Además, su DS también aporta a la estabilidad del sistema, dado que las cadenas hidrofóbicas del grupo octenil succinoilo (OS) pueden adsorberse en la interfase, disminuyendo la formación de cremado y manteniendo el tamaño de gota de las emulsiones. De esta manera, el almidón N-Creamer 46® se constituye como el más promisorio para ser empleado como agente emulsificante en formulaciones tipo emulsión con potencial aplicación en el diseño de productos farmacéuticos

Poster 16

Estudio del comportamiento reológico de emulsiones tipo O/W constituidas por almidón modificado hidrofóbicamente y aceite de Sacha Inchi o aceite de nuez como aporte al diseño y formulación de productos farmacéuticos

Andrés Camilo Arana-Linares[1*], Laura Rodríguez-Murcia[1], Vanitty López[2], Carlos Ramírez[2], Carolina P. Mora[1]

[1] Universidad ICESI, Cali, Colombia.

[2] Tecnoquímicas S.A., Cali, Colombia.

Resumen

Las emulsiones son sistemas coloidales líquido-líquido formados por dos fases inmiscibles, agua y aceite, una de las cuales se encuentra dispersa uniformemente en la otra en forma de gotas finas mediante un proceso de homogeneización mecánica.

En la industria farmacéutica son empleadas como sistemas de entrega de principios activos debido a que permiten incorporar varios fármacos con facilidad, logrando las características organolépticas apropiadas para el consumidor. Con el fin de estabilizar dichos sistemas se utilizan diferentes agentes emulsificantes como son los agentes tensioactivos, que contribuyen a garantizar la vida útil del producto. Aunque estos compuestos son los de primera elección en el proceso de formulación de emulsiones, para los tensioactivos aniónicos se ha demostrado que pueden interactuar con el medio biológico del sitio de aplicación del producto y en algunos casos, se han reportado efectos indeseables, como piel seca e irritabilidad, así como, la interacción con proteínas del hígado y la sangre, causando efectos metabólicos a largo plazo y alteración del sistema endocrino del ser humano. Por ello, surge el interés de estudiar alternativas de emulsificación como son los almidones modificados hidrofóbicamente con el propósito de reducir el uso de tensioactivos en formulaciones de tipo emulsión. Asimismo, la caracterización de las emulsiones incorporando la evaluación de sus propiedades reológicas es relevante como indicador de estabilidad del producto y cumplimiento de los estándares de calidad.

Por lo anterior, se realizó la caracterización reológica de dispersiones acuosas de N-Creamer® 46, un almidón modificado hidrofóbicamente con anhidrido octenil succínico (OSA, por sus siglas en inglés), y de emulsiones O/W preparadas a partir de este almidón y los aceites de nuez o de Sacha Inchi. Los sistemas emulsificados se elaboraron a las concentraciones de 16 a 22 % p/p de almidón modificado y el comportamiento reológico se evaluó a través de ensayos de viscosimetría y de viscoelasticidad dinámica de baja amplitud. Las dispersiones acuosas y emulsiones se comportan como fluidos no Newtonianos de tipo pseudoplástico y la viscosidad de los sistemas incrementa con la concentración del biopolímero. Al 16 y 18 % p/p de almidón modificado las emulsiones de aceite de nuez son más viscosas que las de aceite de Sacha Inchi, evidenciando el efecto que tiene la naturaleza de la fase oleosa en el comportamiento de la emulsión. En los ensayos de viscoelasticidad las emulsiones de aceites de nuez o de Sacha Inchi presentan magnitudes del módulo de pérdida superiores a las del módulo de almacenamiento (G" > G') y valores del factor de pérdida menores a 1, indicando que en los sistemas emulsificados predomina un comportamiento viscoso semejante al de un líquido. Adicionalmente, los parámetros reológicos de Bohlin, A y z reportan valores mayores para las emulsiones preparadas con aceite de nuez, evidenciando mayor rigidez e interacciones en la estructura de red tridimensional de estos sistemas y con tendencia ascendente con el incremento de la concentración de N-Creamer® 46 en la dispersión acuosa. De esta manera, se aporta información útil acerca del flujo y deformación de emulsiones preparadas a partir de almidones hidrofóbicos y aceites vegetales, que puede ser empleada en el diseño de productos farmacéuticos.

Poster 17

Obtención y caracterización de sistemas matriciales de quitosano tiolado para la liberación modificada de metotrexato

Yhors Ciro[1*], John Rojas[1,2], Cristian Yarce[1], Constain Salamanca[1,2]

[1] Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

[2] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

El cáncer es uno de los mayores problemas globales de salud pública que se afrontan hoy día. Por esta razón, diferentes sistemas de entrega de agentes anticancerígenos se han desarrollado para aumentar la efectividad del tratamiento y la adherencia del paciente. Entre estos sistemas de entrega, las películas (Ps) se destacan por su capacidad de controlar la liberación de agentes anticancerígenos, consiguiendo una gran concentración de este en el tejido infectado, convirtiéndose en una alternativa promisoria para la quimioterapia local. Así, en este trabajo se generaron Ps a partir de conjugados de quitosano-glutatión con grados de tiolación de 4,4%, 5,1% y 7,0% conteniendo metotrexato, por el método de evaporación en molde. Se evaluaron sus propiedades de superficie como ángulo de contacto y velocidad de absorción de agua por el método de gota sésil, mientras el trabajo de adhesión se determinó por el modelo semi- empírico de Young-Dupré. También, los estudios de liberación in-vitro se realizaron a pH de 4,5 y 7,4, simulando condiciones fisiológicas y los datos se ajustaron a modelos cinéticos de orden cero, uno, Higuchi, Peppas-Sahlin y Korsmeyer-Peppas. Los resultados indican una fuerte relación entre el grado de tiolación y la hidroficilidad de la superficie de las Ps como ángulo de contacto y velocidad de absorción de agua, en tanto que el trabajo de adhesión no fue afectado. Además, la liberación de metotrexato fue controlada por las Ps a través de diversos mecanismos como difusión e hinchamiento/relajación, dependiendo el grado de tiolación y el pH del medio. De esta forma, un aumento del grado de tiolación permitió que el mecanismo de liberación pasara de un comportamiento difusional a uno de hinchamiento/relajación, disminuyendo el porcentaje liberado de metotrexato. Este estudio prueba que las Ps pueden ser utilizadas como dispositivos de liberación modificada local de metotrexato.

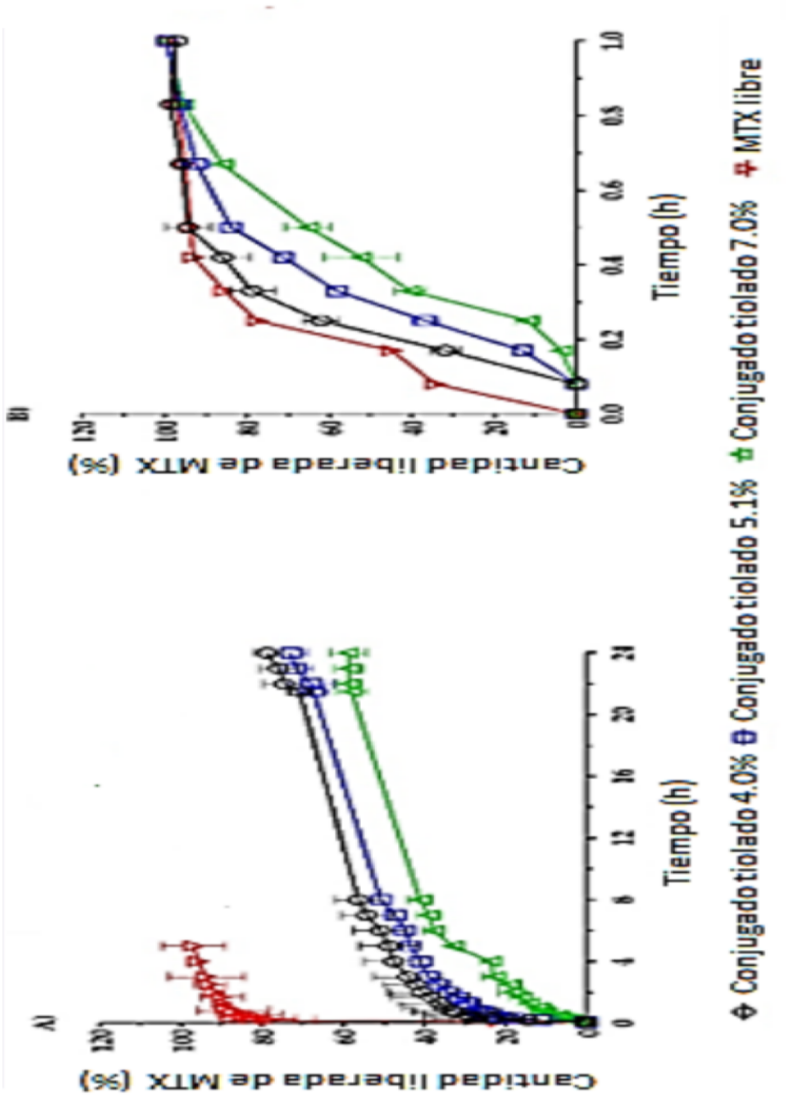
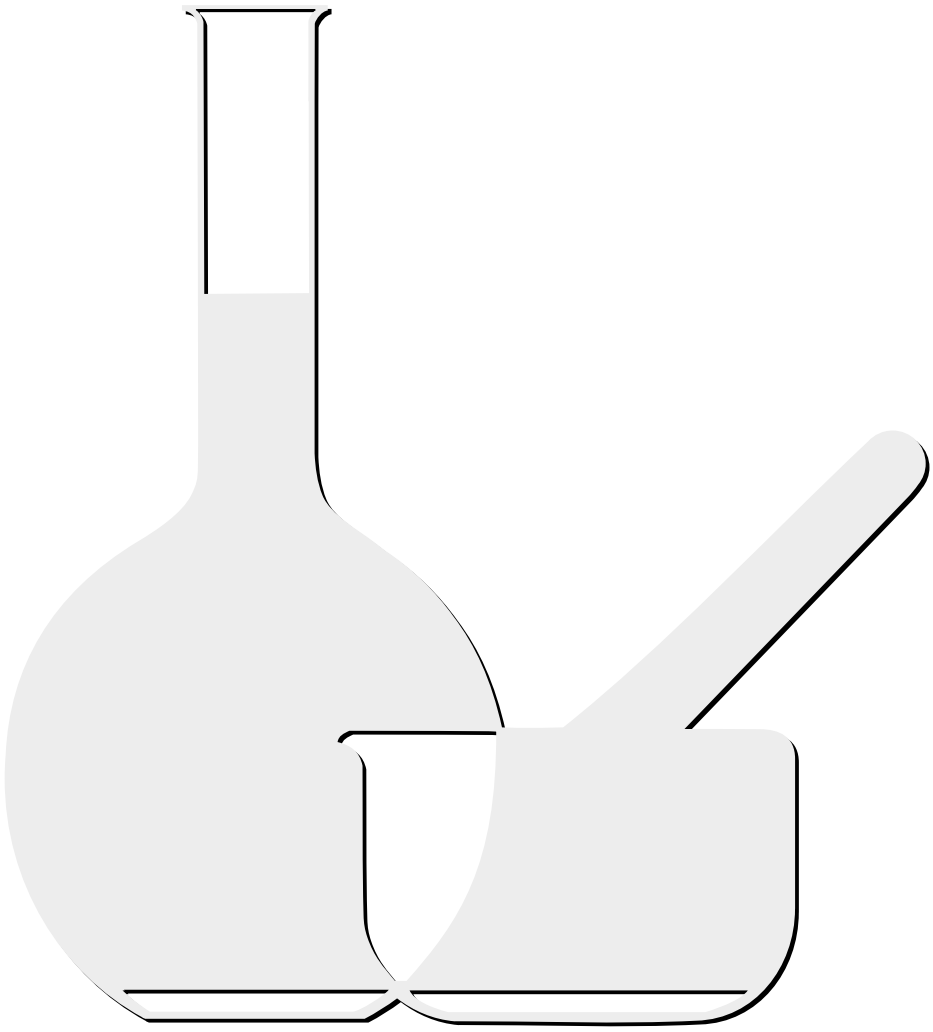


Figura 1. Perfiles de liberación de metotrexato (MTX) desde las diferentes películas de conjugados a pH de A) 4.5 y B) 7.4.



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 rccquifa_fcbog@.unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al Comité Editorial. Después de que los evaluadores o el Comité Editorial lleven a cabo una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de 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 Resumo. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palavras chave (debajo de Resumo). 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 arábiga 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 arábiga de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de las figuras.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencias de los manuscritos

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

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la *revista debe ir en letra itálica*, **volumen en negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencias de Internet: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista *rcciquifa_fcbog@unal.edu.co*

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.° 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/rccquifa

Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 51(2)
se terminó de editar en Proceditor,
en diciembre de 2023.
Bogotá, D. C., Colombia.

DISTRIBUCIÓN
UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
Facultad de Ciencias
GRATUITA