

Facultad de Ciencias  
Sede Bogotá

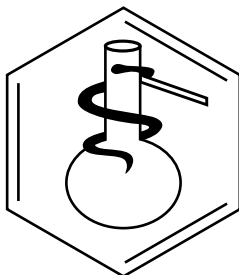


UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA



**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: [rcquiufa\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcquiufa_fcbog@unal.edu.co)

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

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0034-7418&rep=](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=)

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

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

**Vicerrector sede Bogotá:** 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](mailto: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. Itache*, 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.

*Victor 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 Farmacéuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

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

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

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

**Evaluadores:**

*Ángela P. Rojas*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

*Aydi Abdelkarim*, Ph. D., Laboratory Materials, Molecules and Applications, Preparatory Institute for Scientific and Technical Studies, Marsa, Tunisia.

*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.

*Dario A. Tinjaciá*, 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.

*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.

*Marcela Aragón*, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

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

*María A. M. Muñoz*, M. Sc., E.S.E. Hospital Pío XII, Colón, Putumayo, Colombia.

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

*Olga E. García*, Ph. D. (C), Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.

*Oswaldo I. Hernández-Abreu*, Ph. D., División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Conduacán, Tabasco, México.

*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.

*Ruthber Rodríguez-Serrezuela*, Ph. D. (C), Facultad de Ingeniería, Corporación Universitaria del Huila, Neiva, Colombia.

**Asistente editorial:** Anely A. Rivera, B. A.

**Edición, armada electrónica e impresión:** Proceditor Ltda., Bogotá.

Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: [proceditor@yahoo.es](mailto: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](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/rcquiufa>

## Contenido

Avaliação da atividade antimicrobiana e antiaderente do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> contra cepa de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Lorena Thays Rodrigues Sampaio, Ayra Raissa da Silva Santos, Aleson Pereira de Sousa, Heloísa Mara Batista Fernandes, Abrahão Alves de Oliveira Filho	613
Evaluación comparativa del efecto antimicrobiano inmediato y residual de enjuagues bucales sobre biopelículas asociadas a caries dental Román Yesid Ramírez-Rueda, Dabeiba Adriana García-Robayo, Fredy Gamboa	626
Development and characterization of doxycycline gelatin nanoparticles Perla García-Guzmán, Luis Ocampo, Lilia Gutierrez, Hector Sumano, María Josefa Bernad	640
Análise crítica de três guias oficiais de validação de métodos analíticos em vigor no Brasil Debora Helena Vieir, Wildeberg Cal Moreira, Lilia Ribeiro Seródio, Octávio Augusto França Presgrave, Bruno Dallagiovanna, Wlamir Corrêa de Moura	658
Adesão à terapia farmacológica de pacientes diabéticos e o grau de conhecimento sobre a doença Larissa Holanda Assunção Lima, Débora Priscyla Gigante de Sousa, Ergellis Victor Cavalcanti de Lima, Gabriel Carvalho de Souza, Letícia Holanda Assunção, Guilherme Martins Gomes Fontoura, Leonardo Hunaldo dos Santos, Luecy Alves de Carvalho Silva, Aramys Silva Reis	681
Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com fibromialgia antes do tratamento farmacológico Karine Raquel Uhdich Kleibert, Paula Lorenzoni Nune, Emelli Fin Hermann, Ana Paula Weber Fell1d, Lenara Schalanski Krause, Raida Ahmad Musa Mheisen Husein, Francine Lautenchleger, Carmen Cristiane Schultz, Ivan Ricardo Carvalho, José Antonio Gonzalez da Silva, Christiane de Fátima Colet	699
Variantes alélicas de CYP2D6: *3, *4, *5 y *6 en pacientes con enfermedad de Huntington residentes en el municipio de Juan de Acosta, Atlántico (Colombia) Aracely del Carmen García Cuan, Jennifer Andrea Flórez Cifuentes, María Fernanda Macías Puente, Jaime Antonio Navarro Navarro, Fernando Rondón González	720
Bone therapy through drug delivery of chelated [bisphosphonate-metal ions] adsorbed on the surface of carbon nanotubes Fatemeh Mollaamin, Majid Monajjemi	741
Desarrollo de un comprimido de carbonato de litio de liberación prolongada mediante un diseño factorial Leticia Ortega Almanza, Carlos Tomás Quirino Barreda, Lourdes Castillo Granada, Angélica Adame Martínez, Perla García-Guzmán	766
Clinical evolution of acute bronchitis in Colombian children between 2 and 14 years treated with <i>Hedera helix</i> EA575 syrup Danitza Madero Oróstegui, Guillermo Sánchez-Vanegas, Fernando Vera Castro, Andrés Bastidas Manzanares, Angélica Monterrosa-Blanco, Gloria Esperanza Castro, Alvaro Guillermo Vallejos Narvaez	781
Análise das prescrições de psicofármacos de uma farmácia básica em um município do Curimataú Paraibano (Brasil) Angelo Gabriel Caminha de Sousa, Lysrayane Kerullen David Barroso, Maria Emilia da Silva Menezes, Fernando de Sousa Oliveira	796
Determination of bacterial endotoxins in normal intravenous human immunoglobulin on the replacement of rabbit pyrogen testing in Brazil Alessandra Vidal Pereira, Hendro Freitas de Farias, Fernando Faria Fingula, Sheila Regina Gomes Albertino, Lilia Serodio	816
Study to determine the regenerative activity of tincture of <i>Hamamelis virginiana</i> L.	

(Hamamelidaceae), <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek (Celastraceae) and <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae) in an experimental model using <i>Escherichia coli</i> cultures Evelise Camila Primon, Susana Beatriz da Rocha, Renan Marcel Bonilha Dezena, Gustavo Henrique da Silva	826
Estado del arte en la estandarización de extractos vegetales Wilson Leonardo Villarreal Romero, Jorge Eliecer Robles Camargo, Geison Modesti Costa	842
Factores relacionados con la adherencia al tratamiento en pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles en tres ciudades colombianas Dora Inés Molina de Salazar, Miguel Urina Triana, Jazmín Abuabara-Turbay, Tatiana Espinoza-Espitia, Armando Flores-Ramírez, Álvaro Vallejos-Narváez, Gloria Castro	868
Biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and <i>Candida</i> spp. isolated from oral cavity of students of the State University of Goiás, Brazil Reuber Mendes Rocha, Plínio Lázaro Faleiro Naves	889
Drugs solubility prediction in mono-solvents at various temperatures using a minimum number of experimental data points Soma Khezri, Parisa Jafari, Abolghasem Jouyban	908
O uso do hidróxido de vanádio bivalente para a eliminação da sacarose das águas naturais e de esgoto da indústria alimentar e farmacêutica. Uma avaliação teórica Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Nataliia M. Storoshchuk, Sílvio C. de Oliveira, Olga V. Luganska, Vira V. Kopyika, Nataliia V. Novosad, Svitlana M. Lukanova, Yana G. Ivanushko, Valentyna G. Ostapchuk, Svitlana P. Melnychuk, Petro I. Yagodynets, José I. Ferrão de Paiva Martins, Lucinda Vaz dos Reis	955
Elaboración de un bioadsorbente modificado a partir de los desechos de camarón para la descontaminación de aguas residuales Cesar Augusto Londoño Giraldo, Kelly Barrera Enriquez, John Jairo Rojas Camargo	969
Acceso a medicamentos en pacientes con cáncer de mama: una revisión narrativa de la literatura Rolando Enrique Peñaloza Quintero, Manuel Alejandro Machado Beltrán, Camilo Agudelo Orozco, Yesika Tatiana Hernández Sandoval, María Alexandra Matallana Gomez, Angélica María Zapata Matheus, Laura Vanessa Peña, Andrea Carolina Reyes Roja, Jhonathan Felipe Venegas, Jennifer Bueno Rocha	994
Analysis of phytochemical composition, antioxidant activity, and $\beta$ -glucuronidase inhibition potential of <i>Arisaema tortuosum</i> leaf extract Rajni Garg, Rajat Sharma, Diksha Puria, Nnabuk Okon Eddy	1021
Aporte al desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost Mónica Fernández Lozano, Diana Millan, Ronald A Jiménez Cruz	1039
Análisis de la percepción de la población colombiana sobre uso de plantas medicinales mediante procesamiento de lenguaje natural (PLN) Claudia Patricia Ortiz, Manuelita Trujillo Monje, Henry Steven Rebollo-Cortes, Henry Rubiano Daza, Rossember Edén Cárdenas-Torres, Daniel Ricardo Delgado	1058
Perfil químico e atividades farmacológicas da <i>Punica granatum</i> (Punicaceae): uma revisão Antônio Rony da Silva Pereira Rodrigues, Cicero Damon Carvalho de Alencar	1074
Chemical characterization of Copaiba essential oil and study of its cellular cytotoxicity Jacqueline Marques dos Santos, Valéria Barbosa de Souza, André Almeida Schenka, Sílvia de Barros Mazon, Rosana Maria Alberici Oliveira, Carmen Lucia Queiroga, Ildenize Barbosa da Silva Cunha, Renan Marcel Bonilha Dezena, Marcos Nogueira Eberlim, Paulo César Pires Rosa	1097

## Avaliação da atividade antimicrobiana e antiaderente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra cepa de *Staphylococcus saprophyticus*

Lorena Thays Rodrigues Sampaio<sup>1</sup>, Ayra Raissa da Silva Santos<sup>1</sup>, Aleson Pereira de Sousa<sup>2</sup>, Heloísa Mara Batista Fernandes<sup>3</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unidade Acadêmica de Ciências, Centro de Saúde e tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

\*Autor correspondente: [abraham.alves@professor.ufcg.edu.br](mailto:abraham.alves@professor.ufcg.edu.br)

Recebido: 6 de agosto de 2022

Revisado: 8 de março de 2023

Aceto: 12 de março de 2023

### RESUMO

**Introdução:** atualmente, tem aumentado a conscientização sobre as infecções nosocomiais e a espécie *Staphylococcus saprophyticus* vem demonstrando uma problemática em ensaios clínicos por estar associada a essas infecções. Na área odontológica, os produtos naturais vêm sendo bastante estudados devido à busca por produtos com maior atividade farmacológica. Nesse sentido, a *Melaleuca alternifolia*, planta nativa da Austrália, se apresenta como de grande importância medicinal por sua comprovada ação bactericida e antifúngica contra vários patógenos humanos. Seu óleo essencial tem ação inibitória frente à propagação de bactérias, incluindo aquelas resistentes a antibióticos e presentes em infecções hospitalares. **Objetivo:** avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra a cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus*. **Metodologia:** os ensaios foram realizados utilizando as técnicas de microdiluição em caldo em placas de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e técnica de tubos inclinados para determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) ao vidro,

na presença de 5% de sacarose. **Resultados:** observou-se que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* possui uma forte atividade antibacteriana, classificado pela CIM contra a cepa de *Staphylococcus saprophyticus*. A CBM de 512 demonstrou que este óleo atua como bactericida e bacteriostático para a mesma cepa. Quanto à CIMA, foi observado um valor de 1:4, sendo igual ao Digluconato de Clorexidina 0,12%. **Conclusão:** o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* possui forte atividade bacteriana, comportando-se como bactericida e bacteriostático contra a cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus*.

**Palavras-chave:** Antibacteriano, fitoterapia, odontologia.

## SUMMARY

### Evaluation of the antimicrobial and non-adherent activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against a strain of *Staphylococcus saprophyticus*

**Introduction:** Currently, awareness of nosocomial infections has increased and the species *Staphylococcus saprophyticus* has been showing a problem in clinical trials because it is associated with these infections. In dentistry, natural products have been extensively studied due to the search for products with greater pharmacological activity. In this sense, *Melaleuca alternifolia*, a plant native to Australia, presents itself as of great medicinal importance for its proven bactericidal and antifungal action against several human pathogens. Its essential oil has an inhibitory action against the spread of bacteria, including those resistant to antibiotics and present in hospital infections. **Aim:** To evaluate the antimicrobial and non-adherent activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against the clinical strain of *Staphylococcus saprophyticus*. **Methodology:** Assays were performed using broth microdilution techniques in 96-well plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and inclined tube technique to determine the Minimum Adhesion Inhibitory Concentration (MIC) to glass, in the presence of 5% sucrose. **Results:** It was observed that the essential oil of *Melaleuca alternifolia* has a strong antibacterial activity, classified by the CIM against the strain of *Staphylococcus saprophyticus*. The CBM of 512 demonstrated that this oil acts as a bactericide and bacteriostatic for the same strain. As for CIMA, a value of 1:4 was observed, being equal to 0.12% Chlorhexidine Digluconate. **Results:** The

essential oil of *Melaleuca alternifolia* has strong bacterial activity, behaving as bactericidal and bacteriostatic against the clinical strain of *Staphylococcus saprophyticus*.

**Keywords:** Antibacterial, Phytotherapy, Dentistry.

## RESUMEN

### Evaluación de la actividad antimicrobiana y no adherente del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* frente a una cepa de *Staphylococcus saprophyticus*

**Introducción:** actualmente, ha aumentado la conciencia sobre las infecciones nosocomiales y la especie *Staphylococcus saprophyticus* ha mostrado un problema en los ensayos clínicos porque está asociada con estas infecciones. En odontología los productos naturales han sido ampliamente estudiados debido a la búsqueda de productos con mayor actividad farmacológica. En este sentido, *Melaleuca alternifolia*, planta originaria de Australia, se presenta como de gran importancia medicinal por su probada acción bactericida y antifúngica frente a diversos patógenos humanos. Su aceite esencial tiene una acción inhibitoria contra la propagación de bacterias, incluidas aquellas resistentes a los antibióticos y presentes en las infecciones hospitalarias. **Objetivo:** evaluar la actividad antimicrobiana y no adherente del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* frente a la cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus*. **Metodología:** los ensayos se realizaron utilizando técnicas de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos para determinar la Concentración Mínima Inhibidora (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC) y técnica de tubo inclinado para determinar la Concentración Mínima Inhibidora de Adhesión (MIC) al vidrio, en presencia de 5 % sacarosa. **Resultados:** se observó que el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* tiene una fuerte actividad antibacteriana, clasificada por el CIM frente a la cepa de *Staphylococcus saprophyticus*. El CBM de 512 demostró que este aceite actúa como bactericida y bacteriostático para la misma cepa. En cuanto a CIMA, se observó un valor de 1:4, siendo igual a 0,12% de Digluconato de Clorhexidina. **Conclusión:** el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* posee una fuerte actividad bacteriana, comportándose como bactericida y bacteriostático frente a la cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus*.

**Palabras-clave:** Antibacteriano, fitoterapia, odontología.

## INTRODUÇÃO

Dentro da cavidade oral são encontrados diversos microrganismos como bactérias, arqueas, fungos e protozoários, de modo que cada um exerce um papel específico e interagem entre si e com o hospedeiro, tanto na saúde como na doença [1]. A placa bacteriana, também chamada de biofilme é uma comunidade cooperativa, bem organizada, de bactérias aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos [2].

Os gêneros de bactérias de maior prevalência na boca são *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilis*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, dentre outros. Quando há alteração na variedade, ou na proporção populacional dessa microbiota, ocorre uma disbiose, o que favorece a ocorrência de doenças [3]. Dentre as espécies do gênero *Staphylococcus*, a *Staphylococcus aureus* é bastante enfatizada por estar relacionada a infecções purulentas e suas disseminações aos espaços faciais. Entretanto, a espécie *Staphylococcus saprophyticus* vem demonstrando uma problemática em ensaios clínicos por estar associada a infecções hospitalares, com potencial risco em dispositivos invasivos e em grupos com baixa imunidade [4].

Atualmente, tem aumentado a conscientização sobre as infecções nosocomiais, o que tem voltado a atenção para os problemas dos sistemas de controle de infecção hospitalar, sendo cada vez mais importante a avaliação de indicadores de qualidade clínica. As doenças infecciosas que apresentam risco de infecção cruzada no consultório odontológico incluem hepatite C, tuberculose, herpes, infecções orais e do trato respiratório superior. Há necessidade de reforçar a conscientização dos profissionais de odontologia sobre o controle dessas infecções e o risco de contaminação no consultório é elevado. Além disso, pesquisas sobre contaminação bacteriana interna e investigação de bactérias causadoras de doenças infecciosas nos atendimentos odontológicos são escassas [5].

O ambiente e os equipamentos odontológicos se tornam contaminados em decorrência da possibilidade de exposição a secreções e/ou sangue. Dessa forma, o uso de equipamentos de proteção individual por parte dos profissionais de saúde é uma conduta eficiente para prevenção da contaminação, no entanto, a esterilização de instrumentais e a desinfecção de superfícies é imprescindível, uma vez que grande parte dos microrganismos presentes nos consultórios odontológicos vem do meio externo [6].

Genz *et al.* [6] realizou um estudo sobre a contaminação das superfícies de consultório odontológico nas instalações do curso de odontologia de uma universidade em Santa Cruz do Sul, Vale do Rio Pardo, RS, o qual identificou a contaminação majoritaria-



mente por estafilococos coagulase-negativos (80%). O *Staphylococcus saprophyticus* é um dos membros desse grupo, que é comumente responsável por 5% a 10% das infecções do trato urinário, sendo a segunda causa mais frequente dessas infecções, especialmente em mulheres sexualmente ativas [7].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utilizam a medicina alternativa, destacando-se os medicamentos fitoterápicos, para suprir a ausência de atendimento médico primário, principalmente em países da África [8]. Na área odontológica, pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos devido à busca por produtos com maior atividade farmacológica [9]. Além disso, tem se observado a evolução da resistência bacteriana, o que está gerando um grave problema de saúde pública decorrente do uso indiscriminado de antibióticos, o que torna importante gerar estratégias que contribuam para diminuí-la [10].

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos retirados de extratos vegetais, cuja atividade antimicrobiana é devida a vários terpenoides e compostos fenólicos pequenos [11]. Esses compostos são produtos do metabolismo secundário das plantas. Vários óleos essenciais possuem diferentes propriedades biológicas, como atividades anti-inflamatórias, sedativas, digestivas, antimicrobianas, antivirais ou antioxidantes, sendo amplamente utilizados para fins inseticidas, medicinais e cosméticos [12].

A *Melaleuca alternifolia*, planta nativa da Austrália, popularmente conhecida como árvore do chá, tem como principal produto o óleo essencial (TTO – tea tree oil), sendo de grande importância medicinal, pois possui comprovada ação bactericida e antifúngica contra vários patógenos humanos [8]. Jesus, Ellensohn & Barin [13] relataram que o óleo de *Melaleuca* tem dentre muitas aplicações a de desinfecção de ambientes, destacando que o que o torna um excelente antisséptico é a dificuldade que os microrganismos encontram de modificar seu sistema enzimático para criar resistência a ele, devido a sua composição química complexa.

O óleo essencial de *Melaleuca* tem ação inibitória frente à propagação de bactérias, inclusive as que são resistentes a antibióticos, como a *Pseudomonas aeruginosa*, presente em infecções hospitalares. Ademais, também é eficaz contra bactérias isoladas encontradas na superfície da pele, como os estafilococos [14].

Desse modo, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra a cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus*.

## METODOLOGIA

### Material vegetal

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi obtido através de via comercial da marca Via Aroma *Tea Tree*, frasco em vidro âmbar contendo 10 mL de óleo essencial 100% puro sem diluições. Na padronização dos testes antibacterianos foi realizado a diluição do óleo para alcançar os valores de concentração ideais à realização dos testes conforme metodologia.

### Microrganismo

Foi utilizada a cepa de bactéria clínica *Staphylococcus saprophyticus* SA45, que foi mantida em Agar Muller-Hinton (MH) a 4 °C. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas *overnight* em MH a 37°C e diluídas em salina estéril para obter concentração final de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), ajustado pela turvação comparando-se com o tubo 0,5 da escala McFarland [15].

### Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram o meio líquido Muller Hinton e o meio sólido ágar Muller Hinton, O meio de cultura foi adquirido na Difco® e preparado de acordo com as instruções do fabricante.

### Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em “U”. Em uma placa de 96 cavidades, foi adicionado 100 µL caldo Muller Hinton, duplamente concentrado, e 100 µL do óleo essencial de melaleuca, nas concentrações de 1024 a 16 µg/mL. A determinação da CIM foi conduzida com 10 µL do microrganismo em cada cavidade, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. O penúltimo contendo 200 µL do caldo foi inoculado com a suspensão de microrganismo, sendo o controle do crescimento, e o último poço recebeu apenas 200 µL do caldo, sendo o controle negativo. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com as bactérias, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução de resazurina sódica (SIGMA), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo. Foi feita uma nova incubação a 37 °C. A CIM foi determinada como

a menor concentração do óleo essencial que inibiu o crescimento visível do microrganismo e também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do microrganismo [16].

#### Determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculos (10  $\mu$ L) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100  $\mu$ L/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada para a determinação da CBM. Após a incubação a 37 °C por 24 horas foi adicionado 20  $\mu$ L de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37 °C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador [17].

#### Determinação da CIMA

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do óleo essencial de melaleuca foi determinada na presença de sacarose a 5%, de acordo com Albuquerque *et al.* [18] com modificações, usando-se concentrações correspondentes ao composto até a diluição 1:1024. A partir do crescimento bacteriano, a cepa de *Staphylococcus saprophyticus* foi cultivada a 37 °C em caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), depois foram distribuídos 0,9 mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, adicionado 0,1 mL da solução correspondente às diluições do óleo essencial. A incubação foi feita a 37 °C por 24 horas com tubos inclinados a 30°. A leitura foi realizada através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo, após a agitação do mesmo. O ensaio foi realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA). Foi considerada a CIMA a menor concentração do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados acerca da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra as cepas *Staphylococcus saprophyticus* encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2. Analisando esse resultado, observa-se que o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento da cepa SA45, com valor de CIM de 512  $\mu$ g/mL e valor e CBM também de 512  $\mu$ g/mL.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}$  do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

<i>Melaleuca alternifolia</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. saprophyticus</i> SA45
1024	-
512	-
256	+
128	+
64	+
32	+

(-): Não houve crescimento bacteriano (+): Crescimento bacteriano

**Tabela 2.** Concentração Bactericida Mínima (CBM) em  $\mu\text{g/mL}$  do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

<i>Melaleuca alternifolia</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. saprophyticus</i> SA45
1024	-
512	-
256	+
128	+
64	+
32	+

(-): Não houve crescimento bacteriano (+): Crescimento bacteriano

A atividade antimicrobiana considerada forte para óleos essenciais apresenta valor da CIM de até 500  $\mu\text{g/mL}$ , moderada para valores da CIM de 600 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  e fraca para CIM acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$  [19]. Sendo assim, os resultados desse estudo mostram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou uma forte inibição contra a cepa testada, apresentando uma CIM de 512  $\mu\text{g/mL}$ .

Para ser considerado bactericida ou bacteriostático, o composto deve possuir CBM, respectivamente, igual ou duas vezes maior que a CIM ou a CBM ser maior que duas vezes a CIM [20]. De acordo com os resultados obtidos, a *Melaleuca alternifolia* apresenta um potencial bactericida frente à cepa de *S. saprophyticus*, sendo encontrada uma CBM de 512 µg/mL.

O trabalho de Silva e Mejia [14] se propôs a realizar uma revisão sobre a busca crescente por compostos antissépticos naturais devido às constantes adaptações dos microrganismos aos produtos comumente empregados no seu combate, tanto na superfície da pele como em ambientes contaminados. Desse modo, foram expostos estudos que comprovaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, contra diversos microrganismos patógenos humanos, apontando que este óleo é um potente agente antisséptico, frente aos resultados positivos em inibir parcial ou totalmente microrganismos gram-positivos como *Pseudomonas aeruginosa* e os estafilococos, incluindo *S. Saprophyticus*, espécie analisada no presente estudo.

Ao analisar os resultados apresentados no estudo de Prestes *et al.* [21], o qual avaliou a utilização do óleo essencial de *Melaleuca* como coadjuvante no tratamento endodôntico, empregando-o em associação ao hidróxido de cálcio, se percebeu que o óleo essencial apresentou inibição satisfatória frente à *Cândida albicans* e também ao *Enterococcus faecalis*, principais microrganismos envolvidos em infecções secundárias do sistema de canais radiculares e lesões perirradiculares.

O trabalho de Gioppo *et al.* [22] analisou o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca* frente a isolados multirresistentes causadores de infecções hospitalares, sendo eles as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Como resultado, as emulsões do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* inibiram o crescimento dessas bactérias, sendo que a cepa hospitalar de *Escherichia coli* produtora de ESBL mostrou-se a cepa mais sensível, o que permite descrever o potencial antibacteriano do óleo. Dessa forma, percebe-se que todos esses trabalhos corroboram com o presente estudo comprovando o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca*.

A atividade antiaderente é observada nos valores da tabela 3, em que tanto o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, quanto o Digluconato de clorexidina obtiveram um valor de CIMA igual a 1:4.

Considerada como padrão-ouro para o tratamento de doenças bucais, a clorexidina geralmente é mais eficaz contra microrganismos gram-positivos, incluindo os estreptococos do gênero *Mutans*. Porém, a frequente utilização deste antimicrobiano não é aconselhável devido aos efeitos colaterais locais, como a descoloração de dentes, restaurações e próteses, ulceração da mucosa oral e alteração da percepção gustativa [8]. Em

concordância com esse estudo, o óleo essencial de *Melaleuca* pode se mostrar uma alternativa a este agente, uma vez que apresentou a mesma capacidade antiaderente frente à cepa de *Staphylococcus saprophyticus*.

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima de Aderência em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e do digluconato de Clorexidina 0,12%

Melaleuca alternifolia											
$\mu\text{g}/\text{mL}$	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Digluconato de Clorexidina 0,12%											
$\mu\text{g}/\text{mL}$	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) Inibiu a aderência ao tudo (-) Não inibiu a aderência ao tubo.

O estudo realizado por Ramalho *et al.* [23] analisou a atividade antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, ficando evidente que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* apresenta boa eficiência contra a formação do biofilme por esta espécie bacteriana, demonstrando resultado equivalente ao controle digluconato de clorexidina 0,12%, inibindo a formação do biofilme na concentração 1:8. Ou seja, a menor concentração do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* capaz de inibir a adesão da bactéria à parede do tubo foi de 1:8.

## CONCLUSÃO

Ao realizar esse trabalho observou-se que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou atividade antimicrobiana satisfatória, sendo considerado bactericida e bacteriostático para cepa de *Staphylococcus saprophyticus*, além de uma atividade inibitória mínima de aderência *in vitro* satisfatória sobre esse patógeno comum em infecções nasocomiais, apresentando-se como alternativa terapêutica para as infecções decorrentes de contaminação no ambiente e instrumentais odontológicos. Entretanto, os trabalhos que relacionam esse potencial antimicrobiano e antiaderente da *Melaleuca alternifolia* com *Staphylococcus saprophyticus* são escassos, necessitando de mais estudos para destacar sua eficácia.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. B. Sampaio-Maia, I.M. Caldas, M.L. Pereira, D. Pérez-Mongioli, R. Araujo, The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases, *Advances in Applied Microbiology*, **97**, 171-210 (2016).
2. K.I.R. Teixeira, A.C. Bueno, M.E. Cortés, Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie, *Quim. Nova Esc.*, **32**(3), 145-150 (2010).
3. V.E. Germano, C.M.R. Xavier, M.D.M.S. Jales, T.V. Góis-Albuquerque, E.L.F. Lima, L.H. Ribeiro, Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: Revisão de literatura, *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, **16**(2), 91-99 (2018).
4. J.O. Choi, Y.H. Lee, Effect of sanitizers and disinfectants in *Staphylococcus saprophyticus*, *Medico Legal Update*, **20**(1), 2063-2068 (2020).
5. K.O. Yun, H.Y. Kim, A study regarding bacterial contamination of surfaces in dental offices, *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, **47**(4), 279-285 (2015).
6. T.B. Genz, T. Callai, V.R.F. Schlesener, C.F. Oliveira, J.D.P. Renner, Eficácia antibacteriana de agentes de limpeza na desinfecção de superfícies de consultórios odontológicos, *Revista da Faculdade de Odontologia-UPF*, **22**(2), 162-166 (2017).
7. M. Hashemzadeh, A.A.Z. Dezfuli, R. Nashibi, F. Jahangirimehr, Z.A. Akbarian, Study of biofilm formation, structure and antibiotic resistance in *Staphylococcus saprophyticus* strains causing urinary tract infection in women in Ahvaz, Iran, *New Microbes and New Infections*, **39**, 100831 (2021).
8. A.C.M. Oliveira, A. Fontana, T.C. Negrini, M.N.M. Nogueira, T.B.L. Bedran, C.R. Andrade, L.C. Spolidório, D.M.P. Spolidório, Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **13**, 492-499 (2011).

9. K.S.F. Francisco, Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico, *Revista Saúde*, **4**(1), 18-24 (2010).
10. L.L. Cárdenas, M.A. Merchán, D.P. López, New antibiotics against bacterial resistance, *Infectio*, **23**(4), 382-387 (2019).
11. K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single-and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**(2), 909-915 (2012).
12. M. Loose, E. Pilger, F. Wagenlehner, Anti-bacterial effects of essential oils against uropathogenic bacteria, *Antibiotics*, **1**(6), 358 (2020).
13. E.R. Jesus, R.M. Ellensohn, C.S. Barin, Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: otimização do método analítico, *UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas*, **6**(1), 67-72 (2007).
14. P.A.A. Silva, D.P.M. Mejia, Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) para uso como coadjuvante em antissépticos, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **13**(4), 492-499 (2011).
15. E.A.M.D. Bona, F.G.D.S. Pinto, T.K. Fruet, T.C.M. Jorge, A.C.D. Moura, Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos, *Arquivos do Instituto Biológico*, **81**, 218-225 (2014).
16. N.S. Ncube, A.J. Afolayan, A.I. Okoh, Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends, *African Journal of Biotechnology*, **7**(12), 1797-1806 (2008).
17. F.Q.S. Guerra, J.M. Mendes, W. Oliveira, J. Costa, H.D.M. Coutinho, E.O. Lima, Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre *Acinetobacter* spp, *BIOFAR, Revista de Biologia & Farmacia e Manejo Agrícola*, **8**(1), 62-70 (2012).
18. A.C.L. Albuquerque, M.D.S.V. Pereira, J.V. Pereira, L.F. Pereira, D.F. Silva, M.R. Macedo-Costa, Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental, *Revista de Odontologia da UNESP*, **39**(1), 21-25 (2010).



19. A Sartoratto, ALM Machado, C Delarmelina, GM Figueira, MCT Duarte, VLG Rehder. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 275-280, (2004).
20. R.R. Hafidh, A.S. Abdulamir, L.S. Vern, F.A. Bakar, F. Abas, F. Jahanshiri, Z. Sekawi, Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product, *The Open Microbiology Journal*, **5**, 96 (2011).
21. T.S. Prestes, F.R. Victorino, Atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca* associado ao hidróxido de cálcio, VIII EPCC, Encontro Internacional de Produção Científica, 2013. URL: [http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/sete\\_mostra/thaysa\\_sabryna](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/sete_mostra/thaysa_sabryna), acessado em julho de 2020.
22. A. Gioppo, V. Zancanaro, E.H. Bellaver, Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares, *Biotemas*, **32**(3), 35-42 (2019).
23. M.A.S. Ramalho, B. Santos, D.F. Ramalho, S.M.D. Cunha, R.M. Anjos, H.M.B.F. Oliveira, A.P. Sousa, A.A. Oliveira Filho, Atividade antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Research, Society and Development*, **9**(7), e406974245 (2020).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

L.T. Rodrigues-Sampaio, A.R. da Silva-Santos, A. Pereira de Sousa, H.M. Batista-Fernandes, A.A. de Oliveira Filho, Avaliação da atividade antimicrobiana e antiaderente do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra cepa de *Staphylococcus saprophyticus*, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 613-625 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.100718>

# Evaluación comparativa del efecto antimicrobiano inmediato y residual de enjuagues bucales sobre biopelículas asociadas a caries dental

Román Yesid Ramírez-Rueda<sup>1</sup>, Dabeiba Adriana García-Robayo<sup>1,2</sup>, Fredy Gamboa<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología, Centro de Investigaciones Odontológicas, Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4612-5592>

<sup>2</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología, Departamento del Sistema Bucal, Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0770-9138>. Correo-e: [garciaad@javeriana.edu.co](mailto:garciaad@javeriana.edu.co)

<sup>3</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2847-9837>. Correo e: [gamboa@javeriana.edu.co](mailto:gamboa@javeriana.edu.co)

Recibido: 7 de diciembre de 2022

Revisado: 2 de marzo de 2023

Aceptado: 7 de marzo de 2023

## RESUMEN

**Introducción:** la caries dental está asociada a disbiosis de la biopelícula dental. Una de las formas más efectivas de prevenirla o controlarla es el uso de enjuagues bucales. Sin embargo, en el mercado hay una gran diversidad de estos productos, y son pocos los estudios en donde se determine su actividad antimicrobiana en biopelículas. **Objetivo:** evaluar la actividad antimicrobiana de 4 enjuagues bucales comerciales contra 4 microorganismos en un modelo de biopelícula *in vitro* sobre discos de HAp. **Método:** los microorganismos incluidos fueron *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556 y *C. albicans* ATCC 14053. Se desarrollaron biopelículas (en formato individual y en consorcio binomial) sobre discos de HAp por un periodo de 24 horas y se sometieron con cuatro enjuagues comerciales a dos tratamientos, uno de efecto inmediato (TEI- 5 minutos) y otro residual (TER- 55 minutos). **Resultados:** la actividad antimicrobiana de todos los enjuagues bucales fue muy similar. En las biopelículas mono y polimicrobianas

los TEI y TER, se situaron, respectivamente, en rangos de inhibición, de 91,9 a 100%, y de 97 a 100 %. **Conclusión:** todos los enjuagues bucales presentaron una excelente actividad antimicrobiana sobre las biopelículas montadas, con valores de inhibición superiores al 91,9% en el tratamiento TEI y de 97% en el tratamiento TER. Los mejores enjuagues fueron los identificados como uno y dos, y la mayor acción de estos estuvo sobre *C. albicans*.

**Palabras clave:** Caries, biopelícula dental, enjuagues orales.

## SUMMARY

### Comparative evaluation of immediate and residual antimicrobial effect of mouthwashes on biofilms associated with dental caries

**Introduction:** Dental caries is associated to dysbiosis of dental biofilm. One of the most effective ways to prevent or control this disease is the use with mouthwashes. However, there is a great diversity of these products on the market, and there are few studies that determine their antimicrobial activity in biofilms. **Aim:** To evaluate antimicrobial activity of 4 commercial mouthrinses against 4 microorganisms *in vitro* biofilm model on HAp discs. **Methods:** The microorganisms included were *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556 and *C. albicans* ATCC 14053. Biofilms (in individual format and in binomial consortium) were developed on HAp discs for a period of 24 hours and they were subjected to two treatments with the four rinses, one with immediate effect (TEI- 5 minutes) and another residual (TER- 55 minutes). **Results:** The antimicrobial activity of all the mouthrinses was very similar. In mono and polymicrobial biofilms, TEI and TER were located, respectively, in inhibition ranges from 91.9 to 100%, and from 97 to 100%. **Conclusion:** All mouthwashes showed excellent antimicrobial activity on mounted biofilms, with inhibition values greater than 91.9% in the TEI treatment and 97% in the TER treatment. The best rinses were the identified as one and two, and the greatest action of these was on *C. albicans*.

**Keywords:** Caries, dental biofilm, mouthwashes.

## RESUMO

### Avaliação comparativa do efeito antimicrobiano imediato e residual de enxaguatórios bucais sobre biofilmes associados à cárie dentária

**Introdução:** a cárie dentária está associada à disbiose do biofilme dental. Uma das formas mais eficazes de prevenção ou controle é o uso de enxaguatórios bucais. No entanto, existe uma grande diversidade desses produtos no mercado, e poucos estudos determinaram sua atividade antimicrobiana em biofilmes. **Objetivo:** avaliar a atividade antimicrobiana de 4 colutórios comerciais contra 4 microrganismos em modelo de biofilme *in vitro* em discos de HAp. **Métodos:** os microrganismos incluídos foram *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556 e *C. albicans* ATCC 14053. Os biofilmes (em formato individual e em consórcio binomial) foram desenvolvidos em discos de HAp por 24 período de uma hora e foram submetidos a dois tratamentos com os quatro enxaguantes comerciais, um de imediato (TEI - 5 minutos) e outro residual (TER- 55 minutos). **Resultados:** a atividade antimicrobiana de todos os enxaguatórios bucais foi muito semelhante. Nos biofilmes mono e polimicrobianos, o TEI e o TER localizaram-se, respectivamente, em faixas de inibição, de 91,9 a 100% e de 97 a 100%. **Conclusão:** todos os colutórios apresentaram excelente atividade antimicrobiana sobre os biofilmes montados, com valores de inibição superiores a 91,9% no tratamento TEI e 97% no tratamento TER. Os melhores enxaguantes foram os identificados como um e dois, sendo que a maior ação destes foi sobre *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Cárie, biofilme dental, enxaguantes bucais.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la caries dental afecta a más del 50% de los niños y se define como una enfermedad dinámica y multifactorial, mediada por biopelículas cariogénicas [1, 2]. Esta enfermedad es impulsada por un mayor consumo de azúcar y se caracteriza por una desmineralización de los tejidos duros dentales [2]. La placa dental es una biopelícula, organizada de manera ordenada, funcional y puede alojar un gran número de especies microbianas. En el caso de no ser retirada periódicamente, la biopelícula puede convertirse en cariogénica, debido a que comienza a desalojar especies microbianas que mantienen un estado ecológico sano [3, 4].

Diversos estudios clínicos han demostrado que las bacterias asociadas a caries dental son productoras de ácido y tolerantes al mismo, especialmente *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, y *Lactobacillus acidophilus*, que son capaces de desmineralizar el esmalte del diente, convirtiendo rápidamente los azúcares de la dieta en ácido, que conlleva a la disminución del pH en la cavidad oral e inmediaciones del diente [4]. Así mismo, otro microorganismo como *Candida albicans* podría desempeñar un papel importante en la caries dental debido a su naturaleza acidúrica y su capacidad para desarrollar biopelículas, fermentar azúcares de la dieta y producir enzimas que degradan el colágeno, acciones que son especialmente importantes en el desarrollo de caries en la dentina. Investigaciones señalan interacciones sinérgicas entre este hongo y las bacterias cariogénicas dentro de las biopelículas polimicrobianas, lo que convierte a *Candida albicans* en un patógeno candidato en caries dental. De hecho, algunos han planteado la hipótesis de que especies de *Candida* son motores secundarios del proceso patológico en las lesiones cariosas profundas, iniciado principalmente por estreptococos del grupo *mutans* [5, 6].

En la eliminación o reducción de las biopelículas dentales se han empleado varias estrategias, y es la disrupción mecánica (cepillado dental) de las biopelículas el enfoque más utilizado en todo el mundo. Sin embargo, la eficacia de este método de control es limitada debido, entre otras cosas, al cepillado inadecuado o a la imposibilidad de llegar con el cepillo dental a zonas interdentes [7]. Ante esta situación, se han considerado estrategias quimioterapéuticas complementarias como el uso de enjuagues bucales. Desde la década de los años 60, el uso de estos productos se ha vuelto habitual, generalmente después del cepillado. Los principios activos de enjuagues, como el cloruro de cetilpiridinio, el gluconato de clorhexidina y algunos aceites esenciales tienen como fin prevenir la formación de biopelículas sin afectar el equilibrio biológico dentro de la cavidad oral [8, 9]. Un argumento importante a favor del uso de los enjuagues bucales es el hallazgo de que las mucosas orales sirven o actúan como reservorios de microorganismos patógenos que pueden transferirse a la superficie dental, lo que en consecuencia proporciona una justificación adicional para complementar los métodos mecánicos de control de la placa con enjuagues bucales. Estos productos llevarían agentes antimicrobianos a los sitios de la mucosa en toda la boca que no llegan a ser cubiertos por los métodos mecánicos de control de la placa [10].

Las evaluaciones de la eficacia o actividad antimicrobiana que cada producto de higiene oral posee, son realizadas utilizando bacterias en estado plantónico, sin tener en cuenta los sustratos en los que crecen y forman biopelículas, y la multivariabilidad de especies que pueden conformar las biopelículas. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana inmediata y residual de cuatro enjuagues bucales comerciales disponibles en Colombia contra microorganismos formadores

de biopelículas, en formato individual y en combinación binomial, mediante la técnica de reducción de colonias en un modelo de biopelícula *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita.

## MÉTODOLÓGÍA

**Especies microbianas:** Los microorganismos utilizados en el estudio fueron las cepas de referencia: *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556 y *C. albicans* ATCC 14053.

**Enjuagues bucales:** Se utilizaron cuatro enjuagues bucales comerciales identificados como 1, 2, 3 y 4. Con el fin de evitar conflicto de intereses se omitieron las marcas de los enjuagues objeto de estudio.

**Formación de biopelículas:** Para la formación de las biopelículas, discos de HAp (hidroxiapatita) densa (Clarkson Chromatography Products) de 5 mm de diámetro fueron incubados durante 24 horas a 37°C en placas de 96 pozos (Corning™) después de la adición en su orden de 100 µL de sustituto de saliva (Farpag), 100 µL de caldo BHI (infusión cerebro corazón) suplementado con sacarosa al 1% y 10 µL de suspensión microbiana (en forma individual de cada uno de los 4 microorganismos y en forma combinada de *S. mutans* ATCC 35668/*S. salivarius* ATCC 13419, *S. mutans* ATCC 35668/*S. sanguinis* ATCC 10556, *S. mutans* ATCC 35668/*C. albicans* ATCC 14053) ajustada espectrofotométricamente a una densidad óptica de 0.08 a 625 nm y que corresponde aproximadamente a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias)/mL. Después de la incubación los discos de HAp fueron lavados tres veces con solución salina fisiológica (SSF) para luego ser sometidos a tratamiento con los diferentes enjuagues bucales.

**Tratamientos con enjuagues bucales:** La evaluación del efecto antimicrobiano de los enjuagues bucales se enfocó en cuantificar la disminución microbiana de las biopelículas formadas en HAp. Los tratamientos se dividieron en dos grupos, el primero se denominó de “efecto inmediato” (TEI) cuyo objetivo fue evaluar la reducción de la densidad microbiana de la biopelícula después de 5 minutos de exposición del disco de HAp al enjuague; y el segundo, denominado de “efecto residual” (TER), en donde se evaluó la reducción después de 5 minutos de exposición del disco de HAp al enjuague y dejado finalmente en sustituto de saliva durante 55 minutos. Para validar el experimento se montaron discos HAp de control de crecimiento (CC), que fueron expuestos solo a SSF y discos HAp de control de inhibición (CI) que se expusieron a una solución de hipoclorito de sodio al 2,5%. Después de concluidos los tiempos de exposición y con el fin de desprender la biopelícula y hacer los recuentos, los discos HAp fueron lavados

con SSF para luego ser depositados individualmente en un tubo Eppendorf con 1 mL de SSF y ser llevados a agitación continua en vortex a 3200 rpm durante 5 minutos. El recuento de las UFC provenientes de las biopelículas, se realizó por duplicado en superficie en agar BHI practicando diluciones seriadas decimales hasta llegar a  $10^{-4}$  e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Finalmente, se calcularon los porcentajes de inhibición microbiana de TEI o TER de la siguiente manera:

$$\%INH \text{ de TEI o TER} = \frac{\text{UFC DE CC} - \text{UFC de cada tratamiento}}{\text{UFC de cc}} \times 100$$

## RESULTADOS

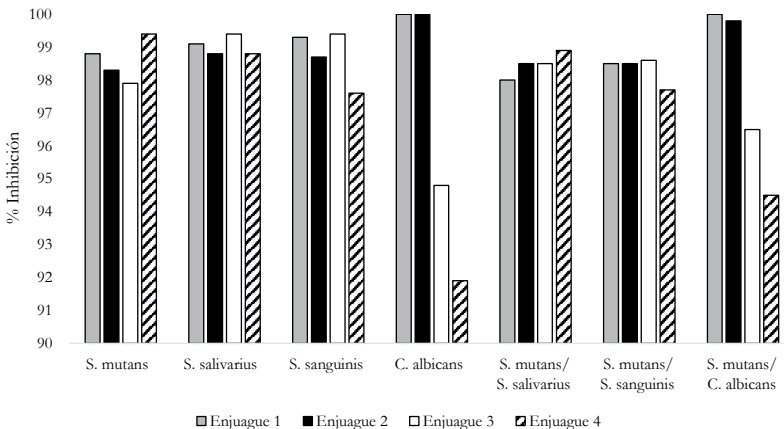
Mediante métodos colorimétricos y de tinción se comprobó para todos los casos la conformación de las biopelículas monomicrobianas y mixtas sobre los discos de HAp. En la Tabla 1 se presenta el recuento de microorganismos en UFC y el porcentaje de inhibición (% INH) en TEI y TER del control de inhibición (CI) y de cada uno de los 4 tratamientos con enjuagues bucales. El recuento de UFC en el CC es la base para realizar el cálculo del % INH de los enjuagues bucales y el CI permite ver la acción real del hipoclorito de sodio al 2,5% con acción antimicrobiana positiva sobre las biopelículas. En el CC de las biopelículas monomicrobianas en el TEI se encontró que la de mayor recuento de UFC fue *S. salivarius* con 1700 UFC, seguido por *S. sanguinis* con 1630 UFC, *S. mutans* con 1080 UFC y finalmente *C. albicans* con 506 UFC. En el mismo CC de las biopelículas polimicrobianas los mayores recuentos fueron para *S. mutans/S. salivarius* (1352 UFC), seguido por *S. mutans/S. sanguinis* (1287 UFC) y *S. mutans/C. albicans* (861 UFC). Los resultados de TER en el CC fueron muy similares a los observados en TEI (Tabla 1). En el CI los % INH en las biopelículas mono y polimicrobianas se situaron para el TEI y TER, respectivamente, en rangos de 99,3 a 100% y de 91,2 a 100% (Tabla 1). El menor efecto del CI en el TEI se presentó sobre *S. mutans* en forma individual y *S. mutans/S. salivarius* con valores en ambos casos de 99,3% de % INH, y en el TER los valores fueron muy similares (Tabla 1).

En relación con la actividad antimicrobiana de los enjuagues bucales evaluados, en biopelículas monomicrobianas, el efecto TEI fue muy similar para todos los enjuagues y los % INH se situaron en un rango de 91,9 a 100%. El mejor efecto de los enjuagues bucales 1 y 2 se notó en *C. albicans* con el 100% de INH en ambos casos, por otro lado, la mejor acción del enjuague 3 se realizó sobre *S. salivarius* y *S. sanguinis* con 99% INH en ambas cepas, y el mejor efecto del enjuague 4 estuvo sobre *S. mutans* con un 99,4 % INH. (Tabla 1, Figura 1). En las biopelículas polimicrobianas el efecto TEI de todos los enjuagues bucales fue muy similar y se situó en % INH de 94,5 a 100%. El

mejor efecto de los enjuagues 1 y 2 estuvo sobre la mezcla *S. mutans*/*C. albicans* con 100 y 99,8 respectivamente de % INH. El mejor efecto del enjuague 3 estuvo sobre el binomio *S. mutans*/*S. sanguinis* con un 98,6% INH, y el mejor efecto del enjuague 4 se presentó sobre *S. mutans*/*S. salivarius* con un % INH de 98,9%.

En cuanto a la acción TER en películas monomicrobianas, los enjuagues presentaron % INH que se sitúan entre 97 y 100 %. El mejor efecto de todos los enjuagues estuvo sobre *C. albicans* con un 100% INH. Continuando con las biopelículas polimicrobianas, el efecto TER de todos los enjuagues bucales fue muy similar y se situó en % INH de 97 a 100 %. El mejor efecto de todos los enjuagues estuvo sobre la mezcla *S. mutans*/*C. albicans*, con 100 % INH de los enjuagues 1, 2 y 3, y de 99,4 % INH del enjuague 4 (Tabla 1, Figura 1).

En concreto en el efecto TEI se pudo observar que los enjuagues 1 y 2 mostraron los mejores resultados, tanto en biopelículas monomicrobianas de *C. albicans* como en biopelículas polimicrobianas en donde está incluida esta levadura. Por otro lado, los enjuagues 3 y 4 presentaron menor efecto inhibitorio sobre *C. albicans*; sin embargo, la acción antimicrobiana de estos dos enjuagues se incrementó con un mayor tiempo de exposición o TER. Finalmente, todos los enjuagues lograron inhibir los microorganismos evaluados con efecto residual (TER), lo que indica que todos ellos permanecieron por al menos 55 minutos con actividad antimicrobiana en la biopelícula montada en discos de hidroxiapatita.



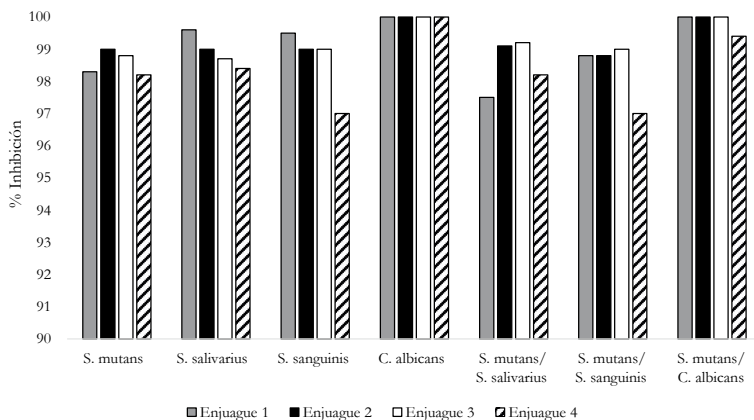
**Figura 1.** Presentación comparativa de la reducción microbiana en porcentajes de inhibición después del TEI (5 minutos) con los 4 enjuagues bucales en los microorganismos *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556, *C. albicans* ATCC 14053 y consorcios en estudio.



**Tabla 1.** Recuento de UFC y porcentaje de inhibición (% INH) después de los tratamientos efecto inmediato (TEI) y residual (TER) con los 4 enjuagues bucales para los microorganismos en forma individual y en combinación

Microorganismo/ Consortio	CC		CI		Enjuague 1		Enjuague 2		Enjuague 3		Enjuague 4	
	UFC × 10 <sup>3</sup>		UFC × 10 <sup>3</sup>		UFC × 10 <sup>3</sup>		UFC × 10 <sup>3</sup>		UFC × 10 <sup>3</sup>		UFC × 10 <sup>3</sup>	
	TEI	TER	TEI (% INH)	TER (% INH)	TEI (% INH)	TER (% INH)	TEI (% INH)	TER (% INH)	TEI (% INH)	TER (% INH)	TEI (% INH)	TER (% INH)
<i>S. mutans</i> ATCC 35668	1080	1050	7 (99,3)	8 (91,2)	13 (98,8)	17 (98,3)	18 (98,3)	10 (99)	22 (97,9)	12 (98,8)	6 (99,4)	18 (98,2)
<i>S. salivarius</i> ATCC 13419	1700	1620	10 (99,4)	0 (100)	15 (99,1)	5 (99,6)	20 (98,8)	15 (99)	10 (99,4)	20 (98,7)	20 (98,8)	25 (98,4)
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	1630	1650	0 (100)	0 (100)	10 (99,3)	7 (99,5)	21 (98,7)	15 (99)	9 (99,4)	15 (99)	38 (97,6)	49 (97)
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	506	502	0 (100)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	26 (94,8)	0 (100)	41 (91,9)	0 (100)
<i>S. mutans</i> ATCC 35668/ <i>S. salivarius</i> ATCC 13419	1352	1341	9 (99,3)	5 (94,6)	26 (98)	33 (97,5)	20 (98,5)	12 (99,1)	19 (98,5)	10 (99,2)	14 (98,9)	23 (98,2)
<i>S. mutans</i> ATCC 35668/ <i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	1287	1259	7 (99,4)	6 (93,5)	19 (98,5)	15 (98,8)	19 (98,5)	14 (98,8)	17 (98,6)	12 (99)	29 (97,7)	37 (97)
<i>S. mutans</i> ATCC 35668/ <i>C. albicans</i> ATCC 14053	861	840	0 (100)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	1 (99,8)	0 (100)	30 (96,5)	0 (100)	47 (94,5)	5 (99,4)
Promedio % INH Global					99.13	99.29	98.97	99.32	97.87	99.24	96.97	98.3

CC: Control de Crecimiento; CI: Control de Inhibición.



**Figura 2.** Presentación comparativa de la reducción microbiana en porcentajes de inhibición después del TER (55 minutos) con los 4 enjuagues bucales en los microorganismos *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556, *C. albicans* ATCC 14053 y consorcios en estudio.

## DISCUSIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial, con participación de múltiples microorganismos y alteración o disbiosis de la biopelícula, que conduce finalmente a desmineralización del tejido dental duro del diente [2,3]. De las bacterias productoras de caries dental destacan especialmente *S. mutans*, *S. sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*. Por otro lado, también sobresale *C. albicans* por su capacidad de generar ácidos a partir de diversos azúcares y formación de biopelículas [4-6]. En la prevención y control de la caries dental y en especial en la eliminación o reducción de las biopelículas dentales se han empleado varias estrategias [7]. En la parte práctica, la disrupción mecánica de la biopelícula a través del cepillado dental ha sido el enfoque más común en todo el mundo. Sin embargo, ante la falta de eficacia de este método se han considerado estrategias quimioterapéuticas para combatir estas biopelículas, entre las que se encuentra el uso de enjuagues bucales, que complementen la acción antimicrobiana. Ante esta situación el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro enjuagues bucales contra *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* ATCC 13419, *S. sanguinis* ATCC 10556, y *C. albicans* ATCC 14053 en forma individual y en consorcio binomial, mediante la técnica de reducción de colonias en un modelo de biopelícula *in vitro* sobre HAp.

Los resultados de este estudio señalan un excelente efecto de los 4 enjuagues bucales evaluados sobre las biopelículas montadas con los 4 microorganismos en forma individual y combinación binomial, tanto en el tratamiento de efecto inmediato (TEI) como en el tratamiento de efecto residual (TER). Los dos mejores enjuagues fueron los identificados como 1 y 2. El efecto inhibitorio de estos enjuagues, se observó sobre todos los microorganismos (en biopelículas en forma individual y en combinación), con valores en el TEI que van de 98 a 100%, y valores TER que van de 97,5 a 100%. La mayor inhibición de estos dos enjuagues estuvo sobre *C. albicans* en forma individual y combinada, y la menor inhibición de estos dos enjuagues estuvo sobre *S. mutans-S. salivarius*. En forma global (promedio de la actividad de los 4 enjuagues) los dos mejores enjuagues también fueron 1 y 2, ya que mostraron, en el TEI, respectivamente, valores de inhibición de 99,13 y 98,97%, y en el TER mostraron valores de inhibición de 99,29 y 99,32%.

De todos los microorganismos evaluados, *C. albicans* fue el microorganismo más susceptible en el TER (en biopelícula individual y en combinación con *S. mutans*) con inhibiciones del 100% de los enjuagues identificados como 1, 2 y 3 de 99,4% con el enjuague 4. Este efecto prolongado y efectivo de 55 minutos *in vitro* sobre *C. albicans*, lleva a pensar que los enjuagues podrían conferir *in vivo* un efecto protector y consistente de largo tiempo, que brinda confianza a la hora de indicarlo para uso en la población general, con el fin de controlar y evitar la proliferación de este microorganismo y la formación de biopelícula en distintos nichos de la cavidad oral.

En contraste, *C. albicans* en el TEI en formato individual presentó susceptibilidades de 100% con los enjuagues 1 y 2, y de 94,8 y 91,9 %, respectivamente, con los enjuagues 3 y 4. En la combinación *C. albicans-S. mutans* los enjuagues 1 y 2, inhibieron respectivamente, 100 y 99,8%, y los enjuagues 3 y 4 presentaron inhibiciones respectivamente de 96,5 y 94,5%. En concordancia con estos últimos hallazgos, en el estudio de Aneja *et al.*, en donde se evaluaron diez enjuagues comerciales (incluido el identificado como 4) contra cuatro microorganismos cariogénicos, se señala la menor susceptibilidad de *C. albicans* [11]. Por otro lado, otro estudio realizado con siete enjuagues comerciales, mostró menor actividad antimicrobiana sobre *C. albicans* expresada en términos de menor zona de inhibición y mayor concentración inhibitoria mínima, y fue precisamente el enjuague 4 el que menor efecto inhibitorio presentó [12]. También Fu *et al.*, señala que los enjuagues que poseen cloruro de cetilpiridinio y clorhexidina fueron los que presentaron mayor actividad contra *C. albicans*, resultados que están de acuerdo con lo reportado en este estudio, en donde el enjuague identificado como 1 muy activo contra este microorganismo, contiene cloruro de cetilpiridinio [12]. Muy probablemente, la variada susceptibilidad de *C. albicans* a los enjuagues bucales se deba a la composición

y formulación de estos productos, a la estructura, conformación y particularidades de la pared celular, y a los diversos productos generados por este microorganismo en el biofilm [11-13].

El cloruro de cetilpiridinio (CCP) es un antiséptico utilizado en muchos productos de uso oral, presenta amplio espectro antimicrobiano y actúa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y hongos, tanto en forma plantónica como sobre células sésiles en modelos de biopelículas [12, 14, 15]. Estos hallazgos son reafirmados por estudios como el de Pandit *et al.* [15] en donde el CCP mostró una actividad antimicrobiana completa en una biopelícula inmadura en rangos de concentraciones de 0,025% -0,1%. También se deja claro que la actividad antimicrobiana del CCP es dependiente del estado inmaduro o maduro de la biopelícula, de la concentración de este agente y del tiempo de tratamiento [15]. De esta manera se nota la capacidad del CCP para romper y alterar los polisacáridos presentes en la matriz de la biopelícula y comprometer la viabilidad celular de *S. mutans* en biopelículas inmaduras [12, 15]. En otro estudio en donde se compara el efecto de CCP y el gluconato de clorhexidina sobre biopelículas de *S. mutans*, se demuestra una mayor efectividad del CCP [12]. Todas las investigaciones anteriores, están de acuerdo con los hallazgos del presente estudio, en el que en un modelo de biopelícula de 24 horas de desarrollo, se demuestra la mayor capacidad de los enjuagues bucales 1 y 2, que contienen CCP, a corto tiempo (TEI-5 minutos) y largo tiempo (TER-55 minutos), sobre todos los microorganismos evaluados. Esta actividad inhibitoria o de reducción microbiana va dirigida hacia las diferentes estructuras y/o composición (diversidad de polisacáridos) y viabilidad de las células sésiles de las biopelículas desarrolladas [12, 15].

En conclusión, es importante señalar el excelente efecto de los 4 enjuagues bucales sobre las biopelículas desarrolladas *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita, con los 4 microorganismos en forma individual y combinación binomial, tanto en el tratamiento TEI como en el TER. Estos hechos respaldan la afirmación de que complementar el cepillado con el uso de enjuagues bucales podría aumentar la acción antimicrobiana *in vivo* sobre los microorganismos que se encuentran dentro de la biopelícula dental.

Por otro lado, es necesario realizar estudios más profundos para: 1. establecer la inhibición específica o reducción, proporción, disposición y existencia o no de antagonismo de cada microorganismo en las biopelículas formadas por los consorcios binomiales, y 2. Determinar la naturaleza y disposición de los polisacáridos presentes en las diferentes biopelículas, antes y después de la exposición a los enjuagues bucales.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

## FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana bajo el proyecto ID8842.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: D.A.G.R.; F.G.J; Adquisición de fondos: D.A.G.R.; F.G.J; Investigación: D.A.G.R.; F.G.J; Metodología: R.Y.R.R; Administración del proyecto: D.A.G.R.; F.G.J; Recursos: D.A.G.R.; F.G.J; Supervisión: D.A.G.R.; F.G.J; Validación: D.A.G.R.; F.G.J; Redacción – borrador original: R.Y.R.R; Redacción – revisión y edición: D.A.G.R.; F.G.J.

## REFERENCIAS

1. f.C. Sampaio, M. Bönecker, S.M. Paiva, S. Martignon, A.P. Ricomini-Filho, A. Pozos-Guillen, B.H. Oliveira, M. Bullen, R. Naidu, C. Guarnizo-Herreño, J. Gomez, Z. Malheiros, B. Stewart, M. Ryan, N. Pitts, Dental caries prevalence, prospects, and challenges for Latin America and Caribbean countries: a summary and final recommendations from a Regional Consensus, *Brazilian Oral Research*, **35**(suppl 01), e056 (2021).
2. S.M. Paiva, N. Abreu-Placeres, M.E.I. Camacho, A.C. Frias, G. Tello, M.F. Perazzo, G.A. Pucca-Júnior, Dental caries experience and its impact on oral health-related quality of life in Latin American and Caribbean countries, *Brazilian Oral Research*, **35**(suppl 01), e052 (2021).
3. D. Berger, A. Rakhamimova, A. Pollack, Z. Loewy, Oral Biofilms: Development, control, and analysis, *High-throughput*, **7**(3), 24 (2018).
4. P.D. Marsh, E. Zaura, Dental biofilm: Ecological interactions in health and disease, *Journal of Clinical Periodontology*, **44**(Suppl 1), S12–S22 (2017).

5. D.F.A. Pereira, C.J. Seneviratne, C.Y. Koga-Ito, L.P. Samaranayake, Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Diseases*, **24**, 518-526 (2018).
6. A.A. Sampaio, S.E. Souza, A.P. Ricomini-Filho, A.A. Del Bel Cury, Y.W. Cavalcanti, J.A. Cury, *Candida albicans* increases dentine demineralization provoked by *Streptococcus mutans* biofilm, *Caries Research*, **53**, 322–331 (2019).
7. T. Larsen, N.E. Fiehn, Dental biofilm infections – An update, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica APMIS*, **125**(4), 376–384 (2017).
8. G.A. Van Der Weijden, K.P.K. Hioe, A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush, *Journal of Clinical Periodontology*, **32**(s6), 214–228 (2005).
9. M.L. Barnett, The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse, *Journal of the American Dental Association*, **137**, S16–S21 (2006).
10. T. Oyanagi, J. Tagami, K. Matin, Potentials of mouthwashes in disinfecting cariogenic bacteria and biofilms leading to inhibition of caries, *The Open Dentistry Journal*, **6**, 23–30 (2012).
11. K.R. Aneja, R. Joshi, C.H. Sharma, The antimicrobial potential of ten often used mouthwashes against four dental caries pathogens, *Jundishapur Journal of Microbiology*, **3**(1), 15–27 (2010).
12. J. Fu, P. Wei, C. Zhao, C. He, Z. Yan, H. Hua, *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes, *Oral Diseases*, **20**(8), 815–820 (2014).
13. R. Pereira, R.O. Dos Santos Fontenelle, E.H.S. de Brito, S.M. de Moraes, Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance, *Journal of Applied Microbiology*, **131**(1), 11–22 (2021).
14. J. Witt, N. Ramji, R. Gibb, J. Dunavent, J. Flood, J. Barnes, Antibacterial and antiplaque effects of a novel, alcohol free oral rinse with cetylpyridinium chloride mouthrinses, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, **6**(1), 1–9 (2005).
15. S. Pandit, J.N. Cai, J.E. Jung, Y.S. Lee, J.G. Jeon, Effect of brief cetylpyridinium chloride treatments during early and mature cariogenic biofilm formation, *Oral Diseases*, **21**(5), 565–571 (2015).

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R.Y. Ramírez-Rueda, D.A. García-Robayo, F. Gamboa, Evaluación comparativa del efecto antimicrobiano inmediato y residual de enjuagues bucales sobre biopelículas asociadas a caries dental, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 626-639 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106166>

## Development and characterization of doxycycline gelatin nanoparticles

Perla García-Guzmán<sup>1</sup>, Luis Ocampo<sup>1</sup>, Lilia Gutierrez<sup>1</sup>, Hector Sumano<sup>1</sup>,  
María Josefa Bernad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

Corresponding author E-mail: [pgarcía@correo.xoc.uam.mx](mailto:pgarcía@correo.xoc.uam.mx)

Received: December 6, 2022

Corrected: March 3, 2023

Accepted: March 8, 2023

### SUMMARY

**Introduction:** Doxycycline (DOXI) is a wide-spectrum antimicrobial drug used for urinary, intestinal, respiratory, ocular, dental, dermatological, and sexually transmitted infections. The development of drug delivery systems based on carriers like nanoparticles (NP) allow to overcome limitations like instability in biological environment, bacterial resistance, and poor cellular penetration. Also, cationic nanocarriers may allow interaction with bacterial membranes or mucus layers to improve the bactericidal action. **Aim:** To develop and to characterize a drug delivery system for DOXI based on cationic gelatin nanoparticles, intended to mucus delivery for antibacterial therapy. **Materials and methods:** Gelatin nanoparticles were prepared using the desolvation method, where the effect of stirring speed, concentration of Pluronic F-68, gelatin and volume of crosslinking agent were investigated. The system was characterized by particle size, zeta potential, FT-IR, SEM, Entrapment efficiency and mathematical modeling of *in vitro* profile release. **Results and discussion:** A stable nanoparticle dispersion (~200 nm, PDI>0.3) was obtained with high entrapment efficiency (~60%) and cationic surface properties, which prolonged release for 8 h. **Conclusions:** The process factors and formulation studied successfully lead a doxycycline loaded cationic gelatin nanoparticles with desirable characteristics. The NP showed prolonged release for 8 hours with an anomalous transport as main mechanism of drug delivery. The system prepared own cationic surface properties to be a possible mucoadhesive system.

**Keywords:** Doxycycline, gelatin, nanoparticles, modified release.



## RESUMEN

### Desarrollo y caracterización de nanopartículas de gelatina de doxiciclina

**Introducción:** la doxiciclina (DOXI) es un fármaco antimicrobiano de amplio espectro utilizado para infecciones urinarias, intestinales, respiratorias, oculares, dentales, dermatológicas y de transmisión sexual. El desarrollo de sistemas de administración de fármacos basados en acarreadores como las nanopartículas (NP), permiten superar limitaciones como la inestabilidad en el entorno biológico, la resistencia bacteriana y la mala penetración celular. Además, los nanoacarreadores catiónicos pueden permitir la interacción con membranas bacterianas o mucosas para mejorar la acción bactericida. **Objetivo:** desarrollar y caracterizar un sistema de administración de fármacos para DOXI basado en nanopartículas catiónicas de gelatina, destinado a la administración en mucosas para terapia antibacteriana. **Materiales y métodos:** se prepararon nanopartículas de gelatina utilizando el método de desolvatación, donde se investigó el efecto de la velocidad de agitación, la concentración de Pluronic F-68, la gelatina y el volumen del agente de entrecruzamiento. El sistema se caracterizó por el tamaño de partícula, potencial zeta, FT-IR, SEM, eficiencia de entrapamiento y modelado matemático del perfil de liberación *in vitro*. **Resultados y discusión:** se obtuvo una dispersión estable de nanopartículas (~200 nm, PDI>0,3) con alta eficiencia de entrapamiento (~60%), propiedades superficiales catiónicas, y liberación prolongada durante 8 h. **Conclusiones:** los factores de proceso y la formulación estudiados permitieron obtener nanopartículas catiónicas de gelatina cargadas con DOXI con características deseables. Las NP mostraron liberación prolongada durante 8 horas con un transporte anómalo como principal mecanismo de liberación de fármaco. El sistema preparado presentó propiedades superficiales catiónicas adecuadas para ser un posible sistema mucoadhesivo.

**Palabras clave:** Doxiciclina, gelatina, nanopartículas, liberación modificada.

## RESUMO

### Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de gelatina de doxiciclina

**Introdução:** a doxiciclina (DOXI) é um antimicrobiano de amplo espectro utilizado para infecções urinárias, intestinais, respiratórias, oculares, dentárias, dermatológicas

e sexualmente transmissíveis. O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos baseados em carreadores como as nanopartículas (NPs) permite superar limitações como instabilidade no ambiente biológico, resistência bacteriana e baixa penetração celular. Além disso, os nanocarreadores catiônicos podem permitir a interação com membranas bacterianas ou mucosas para aumentar a ação bactericida. **Objetivo:** desenvolver e caracterizar de um sistema de liberação de fármacos para DOXI baseado em nanopartículas catiônicas de gelatina, destinado à liberação mucosa para terapia antibacteriana. **Materiais e métodos:** as nanopartículas de gelatina foram preparadas usando o método de dessolvatação, onde o efeito da velocidade de agitação, concentração de Pluronic F-68, gelatina e volume do agente de reticulação foram investigados. O sistema foi caracterizado por tamanho de partícula, potencial zeta, FT-IR, SEM, eficiência de captura e modelagem matemática do perfil de liberação *in vitro*. **Resultados e discussão:** obteve-se uma dispersão estável de nanopartículas ( $\sim 200$  nm, PDI $>0,3$ ) com alta eficiência de captura ( $\sim 60\%$ ), propriedades de superfície catiônica e liberação prolongada por 8 h. **Conclusões:** os fatores de processo e formulação estudados permitiram a obtenção de nanopartículas de gelatina catiônica carregada com DOXI com características desejáveis. As NPs apresentaram liberação prolongada por 8 horas com transporte anormal como principal mecanismo de liberação do fármaco. O sistema preparado apresentou propriedades de superfície catiônica adequadas para ser um possível sistema mucoadesivo.

**Palavras-chave:** Doxiciclina, gelatina, nanopartículas, liberação modificada.

## INTRODUCTION

Doxycycline (DOXI) is a semisynthetic wide-spectrum antimicrobial drug tetracycline derivative. Currently, therapeutic applications for DOXI include urinary, intestinal, respiratory, ocular, dental, dermatological, and sexually transmitted infections, but recently DOXI have demonstrated potential application on anti-inflammatory and anticancer treatments. DOXI can exist in hydrochloride and hyclate salts forms with high solubility and high permeability according to the biopharmaceutical classification (BCS) [1, 2]. Some limitations that can influence the effectiveness of DOXI include instability in biological environment, bacterial resistance, and poor cellular penetration, which hinder drug action in intracellular pathogens [1]. The development of drug delivery systems based on carriers like micro and nanoparticles (NP) allow to overcome those limitations, since tetracyclines are easily oxidized and degraded the NP provides greater stability. In addition, nanocarriers with positively charged surfaces, for instance, improve electrostatic interaction with the negatively charged bacterial wall

and consequent bactericidal action of antibiotics [1]. Besides, the administration of drugs on mucous membranes offers several advantages, including retention at the site of administration, as well as local administration in order to reduce the systemic dose, reducing adverse effects or conversely promoting the absorption of drugs according to the desired effect [3]. Mucoadhesive carriers adhere to the mucosa increasing the residence time at the administration site, while in mucus penetration, micro or nanoparticles can spread over the mucosa and penetrate deep regions so that their residence time increases considerably, reaching the epithelium of absorption [4]. It has been reported that certain surface properties of nanoparticles influence their mucoadhesive or muco-permeation behavior, especially hydrophilic surfaces such as biopolymers. Among the variety of polymers used for the preparation of carriers is gelatin. Gelatin (GEL) is a biopolymer derived from collagen, which has a positive charge at a pH below its isoelectric point (IP) due to the protonation of amino groups of lysine and arginine residues. It is biocompatible and biodegradable, has high availability and low cost. In addition, the release kinetics can be modified by varying the molecular weight of gelatin, as well as the amount of crosslinking agent during preparation. Gelatin carriers have demonstrated to be suitable for mucus administration, for antibacterial drugs like DOXI. Thus, this work aims to develop and characterize a drug delivery system for Doxycycline based on gelatin, intended to mucus delivery for antibacterial therapy.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Gelatin (type A, gel strength  $\sim 225$  g Bloom), Pluronic F-68 and Doxycycline Hyclate were purchased from Sigma-Aldrich. Glutaraldehyde (GA) grade I (25% solution in water) was obtained from Merck. Regenerate cellulose dialysis bag (MWCS 12-14 kDa) was obtained from Spectra/Por, USA. Ultrapure water was obtained with a Barnstead Nanopure diamond system. All buffer solutions were prepared consistent with the USP30-NF25.

### Nanoparticle formulation

Gelatin nanoparticles were prepared using the desolvation method previously reported in the literature with some modifications [5]. Type A gelatin (GEL) was dissolved in deionized water at  $40.0 \pm 1.0$  °C with constant magnetic stirring at 250 rpm. Subsequently, the gelatin solution was adjusted to a pH of  $3.0 \pm 0.1$  with HCl 2.0 N and Doxycycline Hyclate (DOXI) was added. On the other hand, Pluronic F-68 (PF68) was dissolved in acetone at a concentration of 3.0% (w/v) at room temperature and constant magnetic stirring. The solution of Pluronic F-68 was added drop by drop

to the gelatin solution maintaining stirring with an Ultra Turrax® T18 (IKA). Finally, an aqueous solution of glutaraldehyde (2.0% v/v) was added as a crosslinking agent and kept in constant magnetic stirring for 12 h.

The nanoparticles formulation was optimized in one factor at a time, to obtain a stable dispersion. In this regard, various parameters were investigated for their effects on particle size and PDI. In order to optimize the methodology for obtaining the nanoparticles, the effect of some process parameters were investigated, such as: effect of the stirring speed (1000, 5000, 8000 and 10000 rpm), concentration of Pluronic F-68 (0.5, 1, 2, 3 and 5% w/w), gelatin concentration (10 mg/mL and 20 mg/mL) and volume of the crosslinking agent Glutaraldehyde 2.0 % v/v (100, 300, 500, 1000 and 1500  $\mu$ L).

### Nanoparticle characterization

#### *Particle size and Z potential ( $\xi$ )*

The hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) technique using a Zetasizer Zen3600 (Malvern Instruments) at  $25.0 \pm 1.0$  °C with a detection angle of  $173^\circ$  (n=3). The Z potential ( $\xi$ ) was determined with the same equipment by electrophoretic mobility in deionized water (n=3).

#### *Entrapment Efficiency (EE%)*

The entrapment efficiency (%) was determined by centrifugation method or indirect method, by UV-VIS spectrophotometric quantification of doxycycline hyclate contained in the clear supernatant after centrifugation (n=3) [6]. An aliquot of 1.5 mL of the nanoparticles was placed and centrifuged (Biofuge Primo R) at 14000 rpm for 1.0 h. The absorbance of the supernatant at the maximum absorption wavelength ( $\lambda_{\max} = 343.43$  nm) was determined with an S2000 spectrophotometer using a DT1000 deuterium light source, with a SAD500 interface (Ocean Optics, Inc.), using a 10 mm long quartz cell (Prolab). A calibration curve of doxycycline hyclate was prepared in water in a range of 0.5 to 20  $\mu$ g/mL from a stock solution (n=3) and the linearity of the results was evaluated by an analysis of variance (ANOVA) using the Statgraphics Centurion XVIII software. The entrapment efficiency was calculated as follows (equation 1):

$$\text{Entrapment efficiency} = \frac{\text{Total amount of DOX} - \text{Free DOX}}{\text{Total amount of DOX}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

### Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of nanoparticles was determined by scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-35 CF (JEOL) microscope at 20.0 kV with gold coating. A drop

of freshly prepared NP dispersion was deposited and air-dried at room conditions and coated with gold, finally, the sample was analyzed in vacuum.

### Infrared spectroscopy (FT-IR)

The FT-IR spectra were recorded with a Spectrum 400 FTIR/FIR spectrophotometer (Perkin-Elmer). The infrared spectra of the samples were measured in a wavelength range of 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### *In vitro* profile release

The release profile of the prepared systems was evaluated using the dialysis bag method. An amount of NP dispersion was placed in the regenerated cellulose dialysis bag (MWCS 12-14 kDa, Spectra/Por) previously hydrated in deionized water at room temperature for 12.0 h. The dialysis bag was suspended in the release medium (100.0 mL) of phosphate buffer solution pH  $7.0 \pm 0.1$  at  $37.0 \pm 1$  °C in a closed beaker with constant magnetic stirring (250.0 rpm). At specified time intervals, a volume was extracted from the release medium and analyzed using a spectrophotometric method. The medium was replaced by adding an equal amount of fresh medium, which was preheated to  $37.0 \pm 1.0$  °C, after each sampling to maintain sink conditions. An UV-Vis spectrophotometric quantification was performed at the wavelength of maximum absorbance ( $\lambda_{\text{max}} = 343.43$  nm). The analysis was performed on an S2000 spectrometer using a DT1000 deuterium light source, SAD500 port (Ocean Optics, Inc.) with a 10 mm long quartz cell (Prolab).

### *Mathematical modeling of profile release*

There are many theories or kinetic models to describe drug release from controlled or immediate release forms, where the amount of drug released is a function of time. The release data was fitted to two of the most renowned models to describe drug release kinetics and mechanism.

**Higuchi model:** Higuchi is related to particles of active dispersed in homogeneous matrices submitted to a diffusing medium. The simplified Higuchi model describes drug release as a diffusion process based in the Fick's law, square root time dependent (equation 2). This model can be used to describe the drug dissolution from several types of modified release pharmaceutical dosage forms, and is the most widely used model to describe drug release from pharmaceutical matrices. Where  $M_t/M_\infty$  is a fraction of drug releases at time  $t$ ,  $k$  is the release rate constant. The extend model is based on the hypothesis that (i) initial concentration of drug in the system is much higher than the drug solubility, (ii) the edge effect is negligible, which means that diffusion is unidirectional, (iii) drug molecules are much smaller than system thickness, (iv) swell-

ing or dissolution of system is negligible, ( $\nu$ ) drug diffusivity is constant, and ( $\nu i$ ) in the release environment perfect sink conditions are maintained [7].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (\text{Eq. 2})$$

**Korsmeyer-Peppas model (Power Law):** This model is a semi-empirical equation developed by Korsmeyer and Peppas to describe drug release from polymeric systems, it can be seen as a generalization of the observation of the superposition of two apparently independent mechanisms of drug transport, relaxation, and diffusion, usually applied when the release mechanism is not known or when more than one type of phenomenon of drug release is involved (equation 3) [7]. Where  $M_t/M_\infty$  is a fraction of drug releases at time  $t$ ,  $k$  is the release rate constant and  $n$  is the release exponent. Depending on the value of  $n$  that better adjusts to the release profile, concluding for values of  $n= 0.5$  the drug release is governed by Fick diffusion, values of  $n$  between 0.5 and 1.0 corresponds to a non-Fickian transport or anomalous transport, and the mechanism of drug release is governed by diffusion and swelling, and  $n=1.0$  corresponds to Case II transport the mechanism driving the drug release is the swelling or relaxation of polymeric chains [7].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Eq. 3})$$

All fitting models were performed by non-linear direct fitting and analyzed by using DDSolver program as analysis tool. The examination of the goodness of fit statistics was made by comparison of the coefficient of determination or R-square ( $R^2$ ), the adjusted coefficient of determination ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ) due to is more meaningful when comparing models with different numbers of parameters.

## RESULTS AND DISCUSSION

In recent years, gelatin nanoparticles have proven to be carriers with advantages for modified drug release. Gelatin nanoparticles have been developed by various methods such as coacervation, solvent emulsion-evaporation, nanoprecipitation and desolvation [8]. NP were prepared using the desolvation method, which is a widely used method due to its good reproducibility and ease of preparation. In addition, it allows to modify the characteristics of interest in the NP such as size,  $Z$  potential, entrapment efficiency, etc. through the manufacturing conditions [9]. It was prepared a solution of gelatin which was adjusted to pH of  $3.0 \pm 0.1$ , because in acidic conditions, gelatin

type A (Isoelectric point= 7.0-9.0), presents a positive charge by the protonation of the amino groups ( $-\text{NH}_3^+$ ) of lysine residues. During synthesis, the positive charge avoids the uncontrolled agglomeration of gelatin chains, allowing to obtain nanoparticles with better characteristics of size and PDI [10]. The desolvation agent (acetone) was used to dehydrate gelatin chains and induce conformational changes in their structure and subsequently induce precipitation of NP [8]. Finally, GA was used as a crosslinking agent to stabilize the structure of the NPs in order to prevent their rapid dissolution in aqueous media and a rapid release of the drug at body temperature. GA is a crosslinking agent that has been extensively studied with proteins, as it reacts easily at room temperature with the simultaneous formation of aldimine bonds ( $-\text{CH}=\text{N}-$ ) between the amino groups of proteins [11].

Figure 1 shows the results of formulation studies to obtain NP. The effect of various conditions on manufacturing were investigated, studying one parameter at a time: effect of gelatin concentration (10 mg/mL and 20 mg/mL) (Figure 1a), stirring speed (1000, 5000, 8000 and 10000 rpm) (Figure 1b), Pluronic F-68 concentration (0.5, 1, 2 and 3 w/v %) (Figure 1c), and volume of the crosslinking agent Glutaraldehyde (GA) at 2.0 % v/v (100, 300, 500, 1000 and 1500  $\mu\text{L}$ ) (Figure 1d).

Figure 1a showed the results of the concentration of gelatin effect. It was observed that the preparation of NP with a lower concentration of gelatin resulted in a decrease in particle size from 735.3 nm to 341.6 nm, along with a decrease in PDI from 0.224 to 0.208. The low concentration of gelatin allowed the formation of smaller particles with a more homogeneous size distribution. This is due to the lower availability of the biopolymer in the particle formation medium. The gelatin concentration of 10 mg/mL was established and the effect of stirring rate on particle size and PDI was evaluated.

In Figure 1b stirring speed effect was evaluated in particle size (nm) and PDI, in order to obtain a final formulation with particle size  $\leq 250$  nm and polydispersity index  $\text{PDI} \leq 0.3$  which indicates a narrow size distribution. The use of homogenizers in the development of nanoparticles by desolvation method is rarely reported, however, Jia Xue and Qixin Zhong reported the use of high-speed homogenization for the preparation of thymol hybrid nano dispersions based on gelatin and lecithin [12]. It was observed that as the speed of agitation increased, the size decreased from 511.4 nm to 219.8 nm and PDI values were observed from 0.343 to 0.088. The results are similar to other results reported in the literature in that it was observed that increasing the speed of agitation favors the arrangement of chains in small droplets that precipitate allowing the formation of smaller particles. The speed of 10,000 rpm was selected in a high-cut homogenizer (Ultra Turrax®).

Subsequently, in Figure 1c the effect of the surfactant Pluronic F-68 was studied, which allows to stabilize the dispersion of particles and reduce the size according to previous studies reported in the literature [5]. At the concentration of Pluronic F-68 from 0.5 and 1%, the formation of NP was not observed but the appearance of large agglomerates which may be due that at low concentrations, there is not enough surfactant to stabilize the formation of NP and there is agglomeration. From 2 to 3% it was observed the NP formation, however, the smaller particles were obtained at the concentration of 3%, since Pluronic F-68 decreases the surface tension between organic and aqueous phase and leads to the formation of smaller solvent droplets [5]. However, at higher concentrations of Pluronic F-68, an increase in particle size was observed, which may be due an excess that may interact with gelatin significantly increasing the particle size.

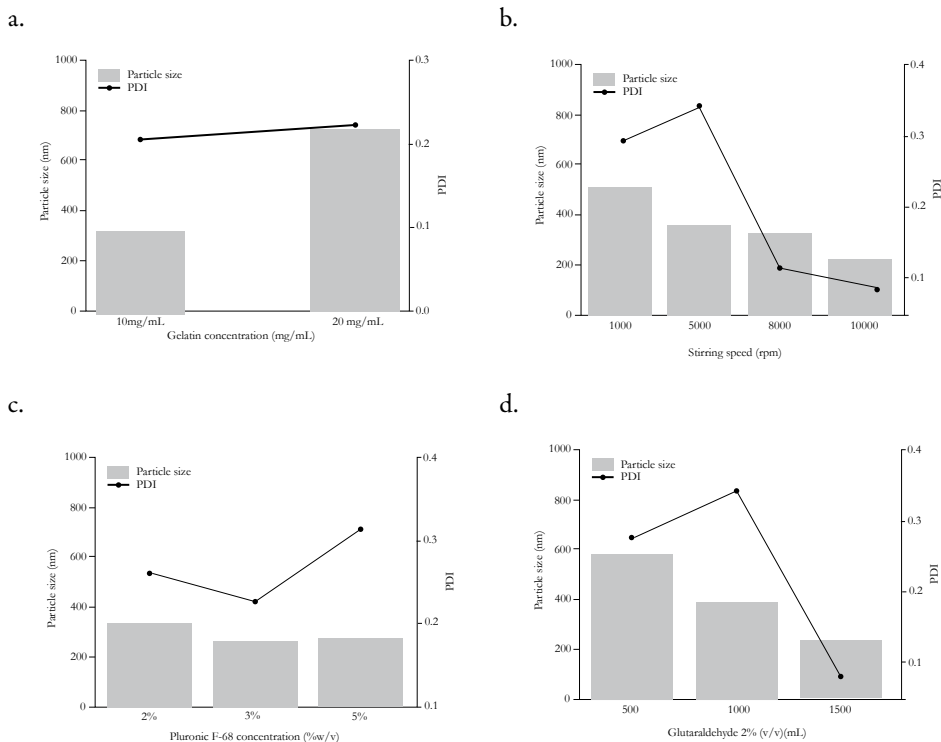
It is known that in gelatin carriers swelling behavior, mechanical and thermal properties depend on the crosslinking degree [13]. Glutaraldehyde (GA) is a well-known crosslinking agent, it have an aldehyde group (-CHO) that reacts with the amino group of the lysine residues of proteins leading an aldimine linkage (-CH=N-) generating inter and intra covalent bonds [14]. To study the effect of glutaraldehyde as a crosslinking agent with 100, 300, 500, 1000 and 1500  $\mu\text{L}$  aliquots of a 2% v/v aqueous glutaraldehyde solution were added to nanoparticles. After crosslinking reaction, the NP were obtained from  $\sim 200$  to  $\sim 600$  nm with PDI from  $\sim 0.2$  to  $\sim 0.3$  as shown in Figure 1d. The addition of 100 and 300  $\mu\text{L}$  was studied, however, the formation of a stable dispersion of NP was not observed. It was possible to obtain a stable dispersed system from 500 to 1500  $\mu\text{L}$ . The addition of the crosslinking agent allowed to obtain a stable system with adequate size with a volume of 1500  $\mu\text{L}$  because at lower volumes of Glutaraldehyde the particle size increased which may be due to the agglomeration of the particles.

A decrease in particle size was observed as glutaraldehyde volume increased from 500 to 1500  $\mu\text{L}$  may be related to the intra-particle crosslinking effect. Finally, Glutaraldehyde is consumed during the cross-linking process and with an adequate purification, there is no evidence of *in vivo* toxicity nor adverse effects have been reported, however minimum concentration of crosslinker was utilized [15, 16].

#### *Particle size and Z potential ( $\xi$ )*

The final formulation presented an average particle size of 214.6 nm with a PDI of 0.090. Figure 2 presents the particle size distribution with the final conditions of the previous formulation studies, where a population with a modal distribution was observed.

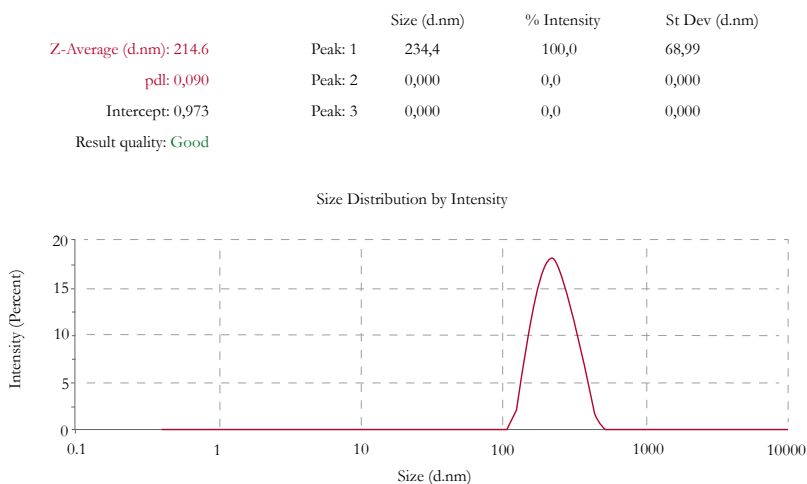




**Figure 1.** Gelatin NP formulation studies

Zeta potential is another important physicochemical parameter that influences the stability of colloidal dispersions. High positive or negative zeta potential values ( $\xi \geq 30$  mV) cause strong repellent forces, whereas repulsion between particles with similar electric charge prevents aggregation of the particles and thus ensures easy redispersion [17]. The NP Z potential was  $22 \pm 1.51$  mV, which is similar to other reports. The nanoparticles were positively charged, this result may indicate the presence of gelatin on the particle surface, according to other reports. The zeta potential was relatively low ( $\xi \leq 30$  mV), however, their surface has a sufficient zeta potential to prevent further agglomeration of the particles observed in good size and PDI measurements [10,18]. Also, cationic nanoparticles have demonstrated to improve oral bioavailability of drugs by mucoadhesion [19]. Gastrointestinal tract is an attractive place for mucoadhesive delivery systems to modified the release of drugs. The mucosal surface is negatively charged, a positive charge on the polymer like gelatin NP might facilitate the mucoadhesive process. A positively charged polymer may be attracted to the biologic surface by electrostatic attraction, followed by mechanical interlocking of the polymer chains by

van der Waals force, hydrogen bond, and other forces [19, 20]. Also, positively charged colloidal drug carriers may increase the permeability and potential uptake of slightly soluble drugs [19].



**Figure 2.** NP Particle size distribution

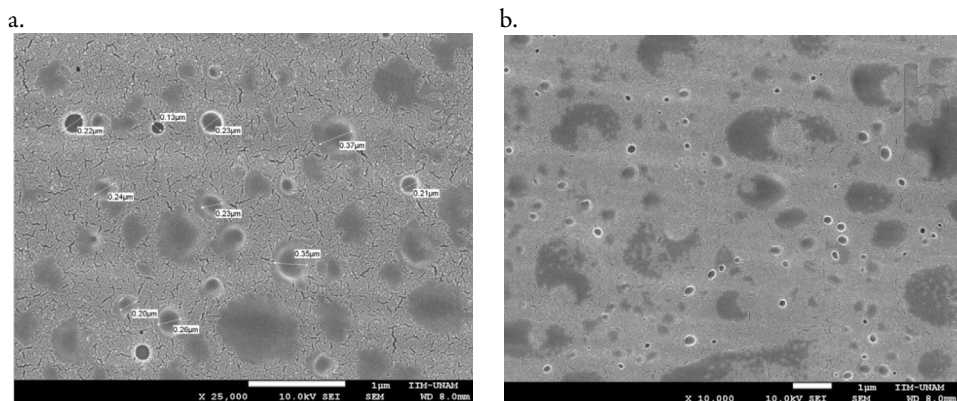
### *Entrapment Efficiency (EE%)*

Once the manufacturing conditions for size, PDI and Z potential were determined, the entrapment efficiency of the system was determined with a calibration curve of Doxycycline hyclate from a stock solution, which was linear ( $R^2=0.999$ ) ( $n=3$ ) in a concentration range of 0.5 to 20  $\mu\text{g/mL}$ . A nanoparticulated formulation is preferred to be with high drug loading capacity to reduce the quantity of the carrier required for administration. The amount of bound drug and the nature of interaction between drug and nanoparticles depend on the chemical structure of the drug as well as the polymer and the conditions of drug loading [13]. It is known that hydrophilic drugs may be loaded into gelatin carriers by incubating the drug with aqueous gelatin solution prior to nanoparticle formation. The entrapment efficiency was determined by an indirect method, and the NPs showed a  $59.83 \pm 1.45\%$  of EE ( $n=3$ ) which is similar to other reports where DOXI loaded gelatin microspheres were prepared with %EE from 49 to 88% [21].

### *Scanning electron microscopy (SEM)*

The shape, size and surface morphology of the NPs were determined by SEM. Figure 3 shows the NPs that were obtained with spherical morphology and smooth surface, without cracks or heterogeneities, this morphology is similar to that obtained by

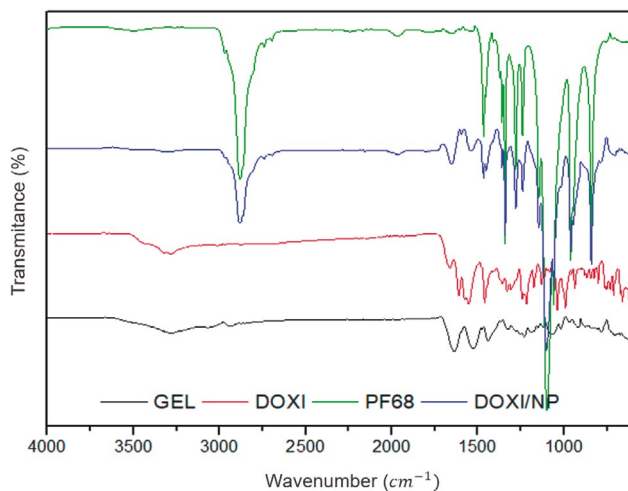
other authors for gelatin nanoparticles used in the release of drugs. The NP observed by SEM presented particle sizes similar to the results obtained by the DLS technique (Figure 3a), which is suitable for administration in mucous membranes orally or nasally.



**Figure 3.** SEM micrographs of Doxycycline loaded NP

#### *Infrared spectroscopy (FT-IR)*

The system obtained together with the individual components (gelatin, Pluronic F68, Doxycycline hyclate) were characterized by FT-IR in the range of 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , with which the characteristic bands of the functional groups of each component were observed. Figure 4 shows the spectra obtained by FT-IR. Pure Doxycycline (DOXI) has characteristic bands in 3331.85  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the vibrations of the bonds (O-H) and (N-H), in 1663.34  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the primary amine (N-H), 1611.09  $\text{cm}^{-1}$  of the carbonyl group (C=O), 1458.05  $\text{cm}^{-1}$  due to the doubling of the group (CH<sub>2</sub>), 1329.80 vibrations (C-H), 1216.67 and 1170.63  $\text{cm}^{-1}$  indicative of the vibrations of the link (C-N). In the spectrum of gelatin (GEL) the characteristic bands of 3282.08  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to amide A (N-H), 1637.22  $\text{cm}^{-1}$  of amide I (C=O), 1528.97  $\text{cm}^{-1}$  of amide II (N-H) are observed. In the spectrum of Pluronic F68 (PF68) the characteristic bands in 3505.65, 2880.76 and 1099.18  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the vibrations of the bonds (O-H), (C-H) and (C-O) were observed. In the spectrum of NPs loaded with DOXI (DOXI/NP), bands are observed in 3306.22  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to amide A (N-H), 1652.15  $\text{cm}^{-1}$  of amide I (C=O), indicative of the presence of gelatin, however there is also the appearance of a new band in 1450.58  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the aldimine bond (R-CH=N-R') which confirms the crosslinking of the amino groups of lysine residues in gelatin with glutaraldehyde (-CHO), the bands indicative of the presence of Pluronic F68 were also observed in 2881.44 and 1102.80  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the bonds (C-H) and (C-O) [8, 22]



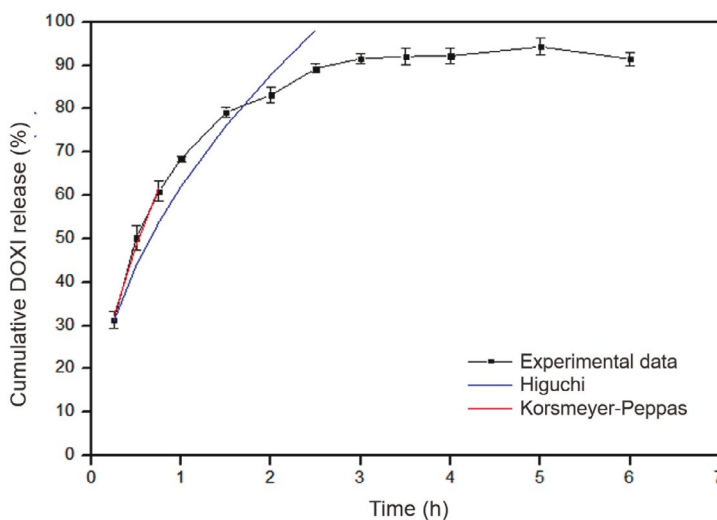
**Figure 4.** FT-IR spectroscopy of the NP and individual components

#### *In vitro* release profile

*In vitro* release studies were performed using the dialysis bag method. Regenerated cellulose bags of pore size of 12-14 kDa (Spectra/Por®) previously hydrated for 12 h were used. Figure 5 presents the release study, which was maintained for 6 hours at  $7.0 \pm 0.1$  at  $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$  it was observed a biphasic patten, since during the first 2 hours the  $83.11 \pm 1.78\%$  ( $n=3$ ) was released. Subsequently, the system was maintained for 5 hours in which up to  $91.46 \pm 1.47\%$  ( $n=3$ ) was released. The system presented a profile with a quick release during the first 2 h and then a slow release until 6 h. The profile found may be suitable to achieve effective plasma concentrations quickly and continue with a slow release until the second administration. It has been reported that the profile of this type of system can be modified, by increasing the crosslinking agent. In addition, since the drug has a hydrophilic character, it can be deposited on the surface of the system, which favors a rapid release at the beginning of the study named Burst effect, as other authors have already reported.

An adjustment of the data obtained was made to the mathematical models of Higuchi and Korsmeyer-Peppas, which is useful to explain the speed and mechanism of release. It was observed that, of the selected models, the particulate system showed a better fit to the Korsmeyer-Peppas model (60%), with respect to the Higuchi model, according to the highest values of  $R^2$  and  $R^2_{\text{adj}}$  (Table 1). The Korsmeyer-Peppas model allows to determine the parameter  $n$ , which is related to different types of release mechanisms, the prepared system presented a value of  $n$  of 0.593 which is related to an

anomalous transport mechanism ( $0.5 > n > 1.0$ ), which is indicative of a combination of mechanisms of Fickian diffusion and swelling. The drug release kinetics from gelatin nanoparticles depends on the rate of water uptake, drug dissolution/diffusion rate and the polymer glass-rubbery transition including matrix erosion/degradation rate [23]. Gelatin is a biopolymer capable of providing this type of mechanism since when in contact with water the highly soluble drug can dissolve and diffuse through the channels of the particle, as well as present a certain degree of swelling. Due to its properties like particle size, zeta potential and prolonged release, the prepared system could be a good candidate for administration on mucus membranes. Since its high isoelectric point (IP=7-9), in different types of mucus such as buccal (pH 6.5-7.5), nasal (pH 5.5-6.5), vaginal (pH 3.5-4), etc. the system would remain positive allowing interaction by electrostatic attraction with mucus [4].



**Figure 5.** NP profile release (experimental data (●)), Higuchi model (blue line), Korsmeier-Peppas model (red line)

**Table 1.** Fitting parameters to mathematical release models

Parameter	Korsmeier-Peppas	Higuchi
$R^2$	0.9895	0.8963
$R^{2\text{adj}}$	0.9790	0.8963

## CONCLUSIONS

The process factors and formulation studied successfully lead a doxycycline loaded gelatin nanoparticles with desirable characteristics as low particle size, narrow particle distribution and high drug entrapment efficiency (>50 %). The system was characterized using various instrumental techniques and *in vitro* tests to evaluate its effectiveness. The NP showed prolonged release for 8 hours with an anomalous transport as main mechanism of drug delivery. The system prepared own cationic surface properties to be a possible mucoadhesive system.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge to posdoctoral program of DGAPA and UNAM for the funding and support of the study.

## 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. R.C. Feitosa, E.S.A. Ishikawa, M.F.A. da Silva, A.A. da Silva-Júnior, L. Oliveira-Nascimento, Five decades of doxycycline: Does nanotechnology improve its properties?, *Int. J. Pharm.*, **618**, 121655 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121655>
2. R. Alshaman, A. Alattar, R.M. El-Sayed, A.R. Gardouh, R.E. Elshaer, A.Y. Elkazaz, M.A. Eladl, M. El-Sherbiny, N.E. Farag, A.M. Hamdan, S.A. Zaitone, Formulation and characterization of doxycycline-loaded polymeric nanoparticles for testing antitumor/antiangiogenic action in experimental colon cancer in mice, *Nanomaterials* (Basel), **12**(5), 857 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/nano12050857>
3. S.K. Lai, Y.Y. Wang, J. Hanes, Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 158–171 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.002>.

4. K. Netsomboon, A. Bernkop-Schnürch, Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **98**, 76–89 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.003>
5. A.A. Kharia, A.K. Singhai, Formulation and evaluation of gastroretentive drug delivery system of acyclovir as mucoadhesive nanoparticles, *Int. J. PharmTech Res.*, **5**, 1538–1545 (2013).
6. V. Pokharkar, V. Patil, L. Mandpe, Engineering of polymer-surfactant nanoparticles of doxycycline hydrochloride for ocular drug delivery, *Drug Deliv.*, **22**, 955–968 (2015). <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.893381>
7. M.L. Bruschi, Mathematical models of drug release, in: *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>
8. A.O. Elzoghby, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research, *J. Control. Release*, **172**, 1075–1091 (2013). Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>
9. S.M. Ahsan, C.M. Rao, The role of surface charge in the desolvation process of gelatin: Implications in nanoparticle synthesis and modulation of drug release, *Int. J. Nanomed.*, **12**, 795–808 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S124938>.
10. S. Jain, P.U. Valvi, N.K. Swarnakar, K. Thanki, Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of Amphotericin B, *Mol. Pharm.*, **9**, 2542–2553 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1021/mp300320d>
11. S. Farris, J. Song, Q. Huang, Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 998–1003 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1021/jf9031603>
12. J. Xue, Q. Zhong, Blending lecithin and gelatin improves the formation of thymol nanodispersions, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 2956–2962 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1021/jf405828s>
13. A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**(1), 1–18 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>

14. J.B. Science, T. Nguyen, B. Lee, Fabrication and characterization of cross-linked gelatin, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **3**, 1117–1124 (2010). Doi: <https://doi.org/10.4236/jbise.2010.312145>
15. P. Lai, W. Daeer, R. Löbenberg, E.J. Prenner, Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **118**, 154–163 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.col-surf.2014.03.017>
16. K.J. Geh, M. Hubert, G. Winter, Optimization of one-step desolvation and scale-up of gelatin nanoparticle production, *J. Microencapsul.*, **33**(7), 595–604 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1228706>
17. J.A. Carvalho, A.S. Abreu, V.T.P. Ferreira, E.P. Gonçalves, A.C. Tedesco, J.G. Pinto, J. Ferreira-Strixino, M. Beltrame Junior, A.R. Simioni, Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **29**, 1287–1301 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1456027>
18. S. Azarmi, Y. Huang, H. Chen, S. McQuarrie, D. Abrams, W. Roa, W.H. Finlay, G.G. Miller, R. Löbenberg, Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **9**, 124–132 (2006).
19. M.H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.*, **249**, 101–108 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00461-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00461-1)
20. J. Wang, Y. Tauchi, Y. Deguchi, K. Morimoto, Y. Tabata, Y. Ikada, Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*, *Drug Deliv.*, **7**, 237–243 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1080/107175400455173>
21. D.V. Way, M. Nele, J.C. Pinto, Production of doxycycline-loaded gelatin microspheres through thermal treatment in inverse suspensions, *Polym. Eng. Sci.*, **58**, 802–809 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1002/pen.24628>
22. G.M. El Maghraby, A.H. Alomrani, Synergistic enhancement of itraconazole dissolution by ternary system formation with pluronic F68 and hydroxypropylmethylcellulose, *Sci. Pharm.*, **77**(2), 401–417 (2009). Doi: <https://doi.org/10.3797/scipharm.0901-08>



23. A.K. Gupta, M. Gupta, S.J. Yarwood, A.S.G. Curtis, Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts, *J. Control. Release*, **95**, 197–207 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.006>

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

P. García-Guzmán, L. Ocampo, L. Gutierrez, H. Sumano, M.J. Bernad, Development and characterization of doxycycline gelatin nanoparticles, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 640-657 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110730>

# Análise crítica de três guias oficiais de validação de métodos analíticos em vigor no Brasil

Debora Helena Vieira<sup>1</sup>, Wildeberg Cal Moreira<sup>1</sup>, Lilia Ribeiro Seródio<sup>1</sup>,  
Octávio Augusto França Presgrave<sup>2</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>3</sup>,  
Wlamir Corrêa de Moura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-900, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>BraCVAM, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-900, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC, 81350-010, Curitiba/PR, Brasil.

\*Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas da Fiocruz.

Recebido: 19 de dezembro de 2022

Revisado: 3 de março de 2023

Aceto: 8 de março de 2023

## RESUMO

**Introdução:** a partir do século XX, com o surgimento das indústrias farmacêuticas após a descoberta da penicilina, acidentes envolvendo fármacos impulsionaram os avanços que culminaram na criação e adoção das boas práticas de fabricação nesta área e, paralelamente, dos princípios e uso mandatório das validações dos processos produtivos e métodos analíticos. Em geral, o guia de validação do ICH é o mais utilizado nesta área. No entanto, têm sido relatadas divergências nas definições dos parâmetros de validação contidos neste guia e em outros. No Brasil existem três guias oficiais em vigor (ANVISA, INMETRO e MAPA). **Objetivo:** analisar criticamente as definições das características de validação contidas nas normas brasileiras oficiais de validação e sua concordância com as definições padrão. **Métodos:** selecionar na literatura específica as definições das características de validação mais coerentes cientificamente e utilizá-las como definições padrão na avaliação das normas oficiais brasileiras. **Resultados:** verificou-se que a concordância das três normas oficiais brasileiras com as definições padrão foi de 37,5%, ANVISA; 50%, INMETRO e 62,5%, MAPA. **Conclusões:** é fundamental ter definições claras e cientificamente

relevantes para as diferentes características de validação e utilizar métodos estatísticos adequados para a sua avaliação. Uma harmonização entre as diferentes normas oficiais seria de grande importância para evitar discrepâncias entre os setores regulados pelos diferentes órgãos no país.

**Palavras-chave:** Ensaios, métodos analíticos, validação.

## SUMMARY

### Critical analysis of three official guides for the Validation of Analytical Methods in force in Brazil

**Introduction:** From the XX century, with the emergence of pharmaceutical industries after the discovery of penicillin, accidents involving drugs boosted advances that culminated in the creation and adoption of good manufacturing practices (GMPs) in that field and, in parallel, with the principles and mandatory use of validations of processes and analytical methods. In general, the ICH validation guide is the most used in this area. However, improprieties and discrepancies in the definitions of validation characteristics contained in this guide and others have been reported. In Brazil there are three official guides in force at present (ANVISA, INMETRO and MAPA). **Aim:** To critically analyze the definitions of the validation characteristics contained in the official Brazilian validation guidelines and their agreement with the standard definitions. **Methods:** the definitions were selected from the specific literature and use them as standard definitions in the evaluation of official Brazilian guidelines. **Results:** It was found that the agreement of the three official Brazilian norms with the standard definitions for the validation characteristics was 37.5%, ANVISA; 50%, INMETRO and 62.5%, MAPA. **Conclusions:** It is essential to have clear and scientifically relevant definitions for the different validation characteristics and to use appropriate statistical methods for its evaluation. Harmonization between the different official standards would also be important to avoid discrepancies between the sectors regulated by the different bodies in the country.

**Keywords:** Analytical methods, assays, validation.

## RESUMEN

### Análisis crítico de tres guías oficiales de validación de métodos analíticos vigentes en Brasil

**Introducción:** a partir del siglo XX, con el surgimiento de las industrias farmacéuticas tras el descubrimiento de la penicilina, los accidentes con medicamentos impulsaron avances que culminaron con la creación y adopción de buenas prácticas de manufactura (BPM) en ese campo y, paralelamente, con los principios y uso obligatorio de validaciones de procesos y métodos analíticos. En general, la guía de validación del ICH es la más utilizada en este ámbito. Sin embargo, hay irregularidades y discrepancias en las definiciones de las características de validación contenidas en esta y otras guías. En Brasil existen actualmente tres guías oficiales vigentes (ANVISA, INMETRO y MAPA). **Objetivo:** analizar críticamente las definiciones de las características de validación contenidas en las directrices oficiales de validación brasileñas y su concordancia con las definiciones estándar. **Métodos:** seleccionar de la literatura específica las definiciones de las características de validación científicamente más coherentes y utilizarlas como definiciones estándar en la evaluación de las directrices oficiales brasileñas. **Resultados:** se constató que la concordancia de las tres normas oficiales brasileñas con las definiciones estándar para las características de validación fue del 37,5%, ANVISA, 50%, INMETRO y 62,5%, MAPA. **Conclusiones:** es fundamental tener definiciones claras y científicamente relevantes para las diferentes características de validación y utilizar métodos estadísticos apropiados para su evaluación. También sería importante la armonización entre las diferentes normas oficiales para evitar discrepancias entre los sectores regulados por los distintos organismos en el país.

**Palabras clave:** Ensayo, métodos analíticos, validación.

## INTRODUÇÃO

A partir do século XX, com o surgimento das indústrias farmacêuticas após a descoberta da penicilina, acidentes envolvendo fármacos impulsionaram os avanços que culminaram na criação e adoção das boas práticas de fabricação e, paralelamente, dos princípios e uso mandatório das validações dos processos de fabricação e métodos analíticos [1].

A necessidade de validação na indústria, como meio de garantir que as empresas sigam a rigor os procedimentos com relação aos processos de produção e controle da qualidade, está intrinsicamente ligada à evolução da qualidade no setor industrial de maneira geral e à criação e evolução das Boas Práticas de Fabricação - BPF [2].

A importância da validação de métodos tem sido enfatizada desde o final dos anos 40, quando a American Chemical Society e a Merck & Co. levantaram a questão de como a matemática e a estatística são pré-requisitos necessários para o desenvolvimento e adaptação bem-sucedida de novos métodos analíticos [3].

O processo de validação de um método analítico consiste na sua avaliação sistemática por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido sejam atendidos [4].

Em um contexto geral, a validação de métodos é um processo que consiste em pelo menos cinco etapas distintas, a saber: qualificação do sistema, amostragem, preparação da amostra, análise e avaliação dos dados [5].

No início dos anos 80, foi apontado que as definições dos parâmetros característicos para validação de métodos e tópicos relacionados eram diferentes entre as organizações existentes. Em 1990, a *International Conference on Harmonization* (ICH) foi criada como um projeto único para reunir as autoridades reguladoras da Europa, Japão e Estados Unidos com o objetivo de alcançar uma maior harmonização de parâmetros, requisitos e, até certo ponto, também metodologia para validação de métodos analíticos [5].

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia Q2 (R1) da ICH [6]. No presente, uma revisão do documento está em andamento para incluir aplicações mais recentes de procedimentos analíticos e para alinhar o conteúdo com o novo documento Q14 (ICH, analytical procedure development Q14 – draft version 2022), ambos se encontrando na fase de consulta pública, sendo o mesmo intitulado Q2 (R2).

Entretanto, têm sido relatadas impropriedades e divergências nas definições dos parâmetros de validação contidos neste guia, assim como em outros [5, 7, 8]. O conhecimento e a compreensão dessas diferenças significativas de terminologia e definições são essenciais, pois as metodologias propostas para atender aos critérios da definição podem gerar confusão na elaboração do protocolo de validação e do desenho experimental [9].

No Brasil são três os guias oficiais em vigor mais relevantes para a área farmacêutica, a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA [4], aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases

de produção, sendo de grande importância na área farmacêutica de uso humano; o guia de Validação de Procedimentos Analíticos, Controle da Qualidade para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA [10] voltado à área de produtos de uso veterinário; e um documento de caráter orientativo sobre Validação de Métodos Analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro [11], voltado aos laboratórios acreditados ou postulantes à acreditação pelo Inmetro na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 [12] e aos avaliadores e especialistas na área de laboratórios de ensaios. Uma vez que, no Brasil, o único organismo reconhecido de acreditação de laboratórios nesta norma é a Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre) do Inmetro, pela Divisão de Acreditação de Laboratórios (Dicla), este documento deve abranger uma ampla gama de naturezas de ensaios, estando listadas cerca de 70 áreas de atividades no Sistema de Consulta aos Escopos de Acreditação do Inmetro.

A acreditação realizada pela Cgcre é de caráter voluntário e representa o reconhecimento formal da competência de um Organismo de Avaliação da Conformidade (OAC) para desenvolver suas atividades de acordo com requisitos preestabelecidos.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 no item 7.2.2 Validação de métodos estabelece que o laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório e métodos normalizados utilizados fora de seu escopo pretendido ou modificados de outra forma. A validação deve ser tão abrangente quanto for necessária para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou campo de aplicação [12].

A Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas) é constituída por laboratórios analíticos, públicos ou privados, habilitados pela Anvisa, capazes de oferecer serviços de interesse sanitário com qualidade, confiabilidade, segurança e rastreabilidade [13].

A habilitação concedida relaciona o código Reblas ao endereço e ao escopo analítico do laboratório e seus critérios são estabelecidos pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 390, de 26 de maio de 2020 [14]. A habilitação na Reblas tem como escopos de atuação as seguintes categorias de produtos acabados: produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes; hemoderivados; insumos farmacêuticos; medicamentos; produtos para saúde; saneantes; vacinas; alimentos e produtos de cannabis [13].

Para habilitação na Reblas, o laboratório analítico deve apresentar comprovante da implantação do Sistema de Gestão da Qualidade Laboratorial no escopo a ser habilitado por meio de Relatório de Avaliação do Laboratório Analítico ou da acreditação pelo Inmetro segundo a norma vigente ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Para o credenciamento de laboratórios junto ao MAPA com a finalidade de atender, de forma complementar, aos programas e controles oficiais do MAPA, suprimindo demandas por ensaios laboratoriais excedentes, não atendidas pelos laboratórios do próprio MAPA é exigido que o laboratório solicitante possua acreditação na ABNT NBR ISO/IEC 17025, pelo INMETRO, contemplando os ensaios constantes na solicitação de credenciamento [15].

Este estudo teve como objetivo analisar criticamente as orientações das características de validação contidas em três normas brasileiras oficiais e sua concordância com as definições mais relevantes cientificamente para as principais características recomendadas no processo de validação de métodos analíticos.

## METODOLOGIA

Foram identificadas as definições das características de validação mais coerentes cientificamente nas normas internacionais, assim como na literatura específica, as quais foram utilizadas como um padrão na avaliação de três normas oficiais brasileiras. Para tanto, foram consultadas as normas da *Association of Official Analytical Chemists* [16], *International Organization for Standardization* - ISO 5725 [17], *International Council for Harmonisation* - ICH [6], *International Organization for Standardization* - ISO 3534-2 [18], *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC [19], Vocabulário Internacional de Metrologia - VIM [20], EURACHEM/*Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry* - EURACHEM/CITAC [21] e os artigos de Araujo [5], Hubert *et al.* [7] e Rozet *et al.* [8].

Foram analisadas criticamente as definições das características de validação contidas em três normas brasileiras oficiais, RDC nº166 da ANVISA [4], documento orientativo sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO [11] e o guia de Validação de Procedimentos Analíticos do MAPA [10] e sua concordância com as Definições Padrão.

Como forma de avaliação entre as Definições Padrão e os guias brasileiros, foi elaborada a seguinte pontuação para cada parâmetro de validação: “0” quando não há concordância nenhuma com as Definições Padrão; “1” quando há uma concordância parcial (caracterizada pelo uso indevido de alguma terminologia em uma definição cientificamente coerente, como exatidão (ICH) em vez de veracidade) e “2” quando há uma concordância integral.

Foi calculado também o percentual (%) de concordância entre a Definição Padrão de cada característica, considerando apenas duas possibilidades: concorda (para a carac-

terística com a pontuação “2”) ou discorda (para a característica com a pontuação “0” ou “1”). Foi ainda avaliada a concordância entre as definições contidas nas três normas entre si.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características de validação selecionadas para a elaboração do padrão utilizado na avaliação das três normas brasileiras foram: seletividade, função de resposta/curva de calibração, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, veracidade e faixa de trabalho/intervalo.

### 1. Definições Padrões das características de validação

#### 1.1 Seletividade

Seletividade refere-se à extensão em que o método pode ser utilizado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes, sem interferências de outros componentes na mistura [21].

#### 1.2 Função de resposta / Curva de calibração

Função resposta é a relação existente, dentro de uma faixa especificada, entre a resposta (sinal, e.g. área sob a curva, altura do pico, absorbância) e a concentração (quantidade) do analito na amostra. A curva de calibração é a função de resposta monotônica mais simples (estritamente crescente ou decrescente) que dá medidas confiáveis, ou seja, resultados com adequadas veracidade e precisão [8].

#### 1.3 Linearidade

É a capacidade (dentro de um determinado intervalo) de obter resultados de teste que são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito na amostra [6].

#### 1.4 Limite de detecção

Menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada com precisão aceitável, mas não necessariamente quantificada como um valor exato [6, 16, 19, 21].

#### 1.5 Limite de quantificação

Concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e, portanto, pode ser definido arbitrariamente como limite inferior da faixa de trabalho do método [21].



### 1.6 Precisão

Proximidade de concordância entre os resultados de teste/medição obtidos em condições estipuladas. A precisão depende apenas da distribuição de erros aleatórios e não se relaciona com os valores verdadeiro ou especificados [18].

Conforme declarado em todos os documentos oficiais, a precisão é expressa como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação. Mede o erro aleatório ligado ao procedimento analítico, ou seja, à dispersão dos resultados em torno de seu valor médio.

Para os documentos ISO três níveis podem ser considerados:

- Repetibilidade: expressa a precisão sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo. Também é chamada de precisão intra-ensaio.
- Precisão intermediária: expressa variações dentro dos laboratórios: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes e outros fatores distintos nas determinações.
- Reprodutibilidade: expressa a precisão entre laboratórios (estudos colaborativos, usualmente aplicados para padronização de metodologia).

### 1.7 Exatidão (do termo em inglês *Accuracy*)

O ICH define de forma equivocada exatidão em vez de veracidade. Segundo o VIM [20] o termo “exatidão de medição” não deve ser utilizado no lugar de veracidade de medição.

Segundo a ISO 3534-2 [18], exatidão é a proximidade de concordância entre um resultado de teste ou resultado de uma medição e o valor verdadeiro. Além disso, na definição ISO é adicionada uma nota especificando que a exatidão (*accuracy*) quando combinada a um conjunto de resultados de medição envolve a combinação de erro aleatório e erro sistemático ou tendência e expressa o erro total.

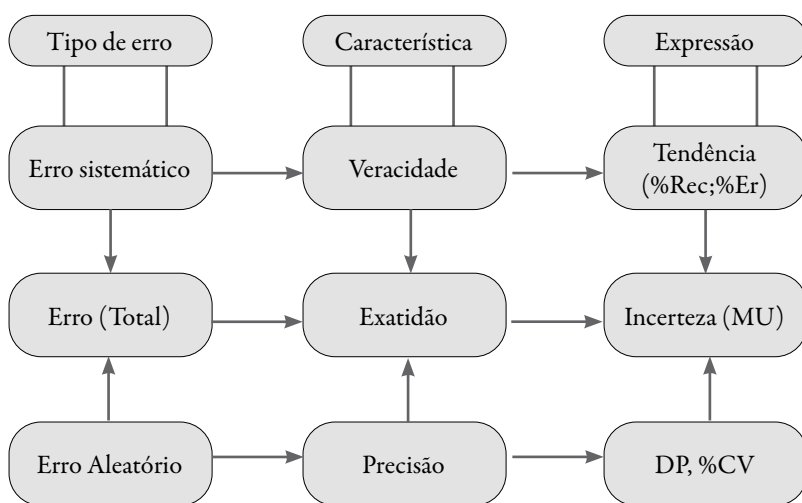
Uma vez que, no presente artigo, haverá frases em que o sentido do termo exatidão se referirá ao seu emprego inadequado, em lugar de veracidade, como usado pelo ICH, ou apropriado, como descrito na norma ISO 5725 [17] se referindo à combinação da veracidade e da precisão, usaremos doravante os termos exatidão (ICH) ou exatidão (ISO), de acordo com o significado na frase.

### 1.8 Veracidade (do termo em inglês *Trueness*)

A norma ISO 5725 [17] define veracidade como “a proximidade de concordância entre o valor médio obtido de uma grande série de resultados de ensaios e um valor de refe-

rência aceito”. A medida de veracidade é normalmente expressa em termos de tendência (do termo em inglês *bias*).

Frequentemente, são utilizados conceitos diferentes para os tipos de erro (erros aleatórios, sistemáticos e total), exatidão (veracidade e precisão) e incerteza. Alguns desses conceitos têm significado qualitativo e alguns são quantitativos [22]. Ao longo dos anos, termos e definições foram alterados e novos termos foram introduzidos. Além disso, diferentes setores ainda favorecem diferentes termos, o que leva a uma grande confusão. A figura 1 ilustra as ligações entre os termos.



**Figura 1.** Ligações entre alguns conceitos fundamentais usados para descrever a qualidade de resultados de medição: tipo de erro de acordo com a característica de validação e sua expressão. %Rec: Recuperação (%); %ER: Erro Relativo (%); MU: *measurement uncertainty*; DP: desvio padrão e %CV: coeficiente de variação (%). Fonte: Adaptado de EURACHEM [22].

### 1.9 Faixa de trabalho / Intervalo

O intervalo entre as concentrações superior e inferior do analito na amostra (incluindo essas concentrações) para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico possui um nível adequado de precisão, exatidão (ISO) (termo usado em vez de Veracidade) e linearidade [6].

## 2. Validação de métodos analíticos

Sistemas de garantia da qualidade, como as BPF e a ISO/IEC 17025 [12], requerem o uso de procedimentos analíticos devidamente validados. Embora seja aceito que para

métodos compendiais basta realizar um estudo de validação parcial que deve avaliar, pelo menos, os parâmetros precisão, exatidão (ICH) e seletividade [4].

A ANVISA e o INMETRO enumeram os casos específicos nos quais é imprescindível validar o método a ser utilizado, com intuito de comprovar essa adequação. São eles: métodos não normalizados; métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados [4, 11], seguindo o preconizado na ISO/IEC 17025.

### 3. Análise crítica das características de validação

Todos os pesquisadores enfrentam as mesmas situações quando necessitam realizar validações de métodos analíticos. Em geral, os analistas consultam documentos de regulamentação ou de orientação e, portanto, a validade dos métodos é dependente da orientação, terminologia e metodologia propostas nesses documentos [8].

Com a finalidade de determinar as características de validação mais importantes a serem abordadas, foi realizada uma revisão crítica das recomendações publicadas nas três normas brasileiras, as definições das características de validação recomendados nelas e a concordância dessas definições com o padrão elaborado nesta pesquisa e, entre si.

#### 3.1 Seletividade

As definições das três normas brasileiras e as internacionais [16, 19-21] são coerentes entre si e com a Definição padrão.

O primeiro critério a ser avaliado por um analista em um método, seria sua capacidade de obter sinais ou respostas livres de interferências e resultar em dados verdadeiros. Essa capacidade de discriminar o analito dos componentes interferentes vinha sendo expressa de forma confusa por muitos anos como “seletividade” ou “especificidade” de um método, dependendo da área de especialização dos autores [8].

A seletividade deve ser conectada com a palavra “escolha”, enquanto a especificidade com a palavra “exato”. Nesse contexto, é incorreto graduar o termo especificidade (ou se tem ou não) [5].

Em contrapartida, a seletividade pode ser classificada como baixa, alta, ruim, parcial, boa etc., a fim de escolher a categoria apropriada para uma determinada finalidade. O termo especificidade refere-se sempre a 100% de seletividade [23], ou, inversamente, 0% de interferências [5].

No entanto, as normas brasileiras oficiais tiveram consenso no uso do termo seletividade em vez de especificidade. Contudo, a Conferência Internacional para Harmonização (ICH) se refere ao parâmetro como especificidade, contrapondo-se às demais organizações.

Segundo o EURACHEM [22], a confirmação da identidade do analito exige que a medição seja realizada por várias técnicas, de preferência independentes. A confirmação aumenta a confiança na técnica avaliada e é especialmente útil quando as técnicas de confirmação operam em princípios significativamente diferentes. Contudo, quando o método de medição que está sendo avaliado é altamente seletivo, a utilização de outras técnicas pode não ser necessária.

### 3.2 Função de resposta, Curva de calibração e Linearidade

A função de resposta, ou curva de calibração, é frequentemente confundida com o critério de linearidade. O critério de linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada por meio da curva de calibração, enquanto que a curva de calibração refere-se à relação entre a resposta instrumental e a concentração [8]. Logo, ao se calcular a linearidade, o método estatístico utilizado na determinação dos resultados obtidos influenciará diretamente na relação entre o introduzido e o recuperado. Na curva de calibração não haverá esta influência. Hubert *et al.* [7] descreveram a utilização de perfis de exatidão e de linearidade para determinar qual o método de cálculo rende resultados mais exatos (ISO) e lineares.

Devido à esta confusão, é comum que estudos de validação tentem demonstrar que a função resposta é linear no sentido clássico, utilizando um modelo linear de mínimos quadrados convencional. O documento do ICH [6] continua mantendo esta confusão. Na parte terminológica do guia Q2 (R1), a linearidade é corretamente definida, mas na seção de metodologia é mencionado que: “A linearidade deve ser avaliada por inspeção visual de um gráfico de sinais em função da concentração ou conteúdo do analito”, o que indica claramente que é o sinal e não mais o resultado que importa na linearidade, confundindo, por um lado, linearidade e curva de calibração e, por outro, resultados de testes e sinal. Na continuação do texto observamos: “Se houver uma relação linear, os resultados dos testes devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, por exemplo, pelo cálculo de uma linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados”. Para um analista, os “resultados dos testes” são, sem ambiguidade, as medidas calculadas avaliadas pela “linha de regressão” que é de fato a curva de calibração, estabelecida por meio de metodologias estatísticas apropriadas [8].

Os critérios de linearidade devem ser aplicados apenas aos resultados [concentração calculada =  $f$  (concentração introduzida)], não às respostas [sinal =  $f$  (concentração introduzida)].

As normas brasileiras coadunam com a Definição Padrão de linearidade, conforme demonstrado na tabela 1. Contudo, tanto a ANVISA como o INMETRO seguem o guia ICH [6] que para a metodologia se referem às medidas calculadas para a linearidade, quando na verdade deveriam se referir à curva de calibração. Da mesma forma o MAPA se refere à linearidade remetendo entre parênteses à curva de calibração. No entanto as recomendações de análise da linearidade do MAPA são as mais coerentes e estão alinhadas ao definido pela AOAC [16] e avaliada com o uso da inspeção visual do gráfico da reta de calibração e do gráfico de resíduos gerados pela regressão linear”.

**Tabela 1.** Definições de linearidade segundo as agências brasileiras.

Instituição	Definição
ANVISA	Linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra [4].
INMETRO	Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra [11].
MAPA	Linearidade (curva de calibração) é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado [10].

Para evitar equívocos, a AOAC [16], IUPAC [19] e VIM [20] definem apenas curva de calibração e não utilizam mais o termo “linearidade”.

Ainda a ANVISA cita na Seção II de Linearidade que “O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990”. A AOAC [16] estipula que um coeficiente de correlação alto (por exemplo, >0,99) é frequentemente recomendado como evidência de qualidade do ajuste, e que o uso desse coeficiente como um teste de linearidade é incorreto. O exame visual geralmente é suficiente para indicar linearidade e não linearidade, ou o uso de teste residual. Afirma ainda que uma resposta linear é desejável, pois simplifica os cálculos, mas não é necessária e nem deve ser considerada como uma característica de desempenho exigida.

### 3.3 Limite de detecção

Não existe incompatibilidade na definição de limite de detecção por parte das organizações normalizadoras, sendo definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada com confiabilidade aceitável, mas não necessariamente quantificada como um valor exato [4, 6, 10, 11, 16, 19, 21]. Contudo, o MAPA define limite de detecção de um equipamento e não do método em si.

Segundo o EURACHEM [22] é necessário distinguir entre o limite de detecção do instrumento e o limite de detecção do método. O limite de detecção do instrumento pode ser baseado na análise de uma amostra, muitas vezes amostra “branco”, apresentado diretamente ao instrumento (ou seja, omitindo quaisquer etapas de preparação da amostra), ou na relação sinal-ruído como, por exemplo, o cromatograma. Para obter um limite de detecção de método, o mesmo deve ser baseado na análise de amostras que foram tomadas ao longo de todo o procedimento de medição usando resultados calculados com a mesma equação das amostras de teste. É o limite de detecção do método que é mais útil para a validação do método e não o limite de detecção do instrumento.

A AOAC [16] relata que a definição de limite de detecção utilizada por parte das organizações normalizadoras contém uma contradição inerente: quanto menor a quantidade de analito medida, maior a falta de confiabilidade da estimativa. À medida que descemos na escala de concentração, o desvio padrão aumenta até o ponto em que uma fração substancial dos valores da distribuição de resultados se sobrepõe a “0” e aparecem falsos negativos. Portanto, a definição do limite se resume a uma questão de qual fração de valores estamos dispostos a tolerar como falsos-negativos.

Desta forma, o VIM [20] define limite de detecção como o valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte num material é “ $\beta$ ”, sendo “ $\alpha$ ” a probabilidade de declarar falsamente a sua presença.

Segundo recomendação da AOAC [16], o limite de detecção é útil apenas para o controle de impurezas indesejáveis que são especificadas como “não mais que” um nível baixo especificado e para contaminantes de nível baixo. Ingredientes úteis devem estar presentes em concentrações altas o suficiente para serem funcionais. O nível de especificação deve ser definido alto o suficiente na faixa de trabalho para que os materiais aceitáveis não produzam mais de 5% de valores falsos positivos, o nível de aceitação estatística padrão. Os limites geralmente dependem diretamente do desempenho do instrumento, que pode ser verificado pelo uso de padrões puros dos compostos.

### 3.4 Limite de quantificação

As definições de limite de quantificação pelas normativas brasileiras são apresentadas na tabela 2.

Tanto a ANVISA como o INMETRO usam a definição de limite de quantificação do ICH que utiliza o termo exatidão erroneamente, tornando essa definição incorreta quando comparada com a Definição Padrão. Todavia, o MAPA em vez de utilizar o termo exatidão, substitui pelo termo correto que é veracidade, quando cita que o limite de quantificação é definido como “o nível mais baixo de concentração no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos”, estando em acordo com a Definição Padrão.

O limite de quantificação é frequentemente determinado por sucessivas diluições de uma mesma amostra, até alcançar o menor nível da concentração do analito em que este pode ser quantificado com confiança [4, 11].

**Tabela 2.** Definições de limite de quantificação segundo as agências brasileiras.

Instituição	Definição
ANVISA	O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e “exatidão” aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [4].
INMETRO	O limite de quantificação de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e “exatidão” aceitáveis [11].
MAPA	Limite de quantificação do procedimento analítico é definido como o nível mais baixo de concentração no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos, desde que a relação sinal/ruído seja superior a seis ( $S/R \geq 6$ ) [10].

Segundo ROZET et al. [8] a melhor maneira de calcular o limite de quantificação é o uso da abordagem do perfil de exatidão que atende aos requisitos dos critérios para o limite de quantificação demonstrando que o erro total do resultado é conhecido e aceitável nesses níveis de concentração, ou seja, um nível aceitável de erros sistemáticos e aleatórios. Os artigos de Hubert *et al.* [24] e Boulanger *et al.* [25] foram os primeiros a introduzir este conceito.

### 3.5 Precisão

A Definição Padrão de precisão é consistente com seu conceito nas normas brasileiras oficiais, como também nos documentos ISO 5725 [17], ICH [6], VIM [20], IUPAC [19] e EURACHEM/CITAC [21].

Conforme declarado nesses documentos, a precisão é expressa como desvio padrão, variância ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação), por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e reprodutibilidade. Mede o erro aleatório ligado ao procedimento analítico, ou seja, a dispersão dos resultados em torno de seu valor médio.

Segundo a ISO 3534-2 [18] para se avaliar a repetibilidade “n” replicatas são testadas nas mesmas condições, na mesma amostra inicial, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento, em um curto período. Já para a precisão intermediária, os resultados de ensaio são obtidos usando uma amostra homogênea em diferentes dias e/ou por diferentes operadores e/ou com diferentes equipamentos no mesmo laboratório. O objetivo final do estudo é obter um procedimento que represente o mais precisamente possível sua variabilidade sob circunstâncias normais de uso.

### 3.6 Exatidão (*Accuracy*) e Veracidade (*Trueness*)

A definição de exatidão pelas normativas brasileiras é apresentada na tabela 3.

**Tabela 3.** Definição de exatidão (*Accuracy*) de acordo com as normas brasileiras.

Instituição	Definição
ANVISA	A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro [4].
INMETRO	Os processos normalmente utilizados para avaliar a <b>tendência</b> de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Nota - A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência [11].
MAPA	O vocabulário internacional de metrologia define a <b>veracidade</b> como: “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”. A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção [10].



Na definição de “exatidão” pela ANVISA, que foi baseada no ICH [6], os dados recomendados para “exatidão” são “expressos pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente”. Isto não se refere mais à “exatidão”, mas sim à veracidade como definida no documento da ISO 5725 porque ela é o valor médio de vários resultados – como oposto a um único resultado para a exatidão – que é comparada ao valor verdadeiro, como afirmado anteriormente. Esta seção refere-se aos erros sistemáticos enquanto exatidão como definido no ICH Q2 (R1) parte 1 e ISO 5725-1 corresponde à avaliação do erro de medida [9].

O MAPA não faz referência alguma em seu documento sobre exatidão e sim ao termo correto veracidade/recuperação. Definindo ainda recuperação como uma expressão de sua veracidade pela medição da tendência total do procedimento analítico. Já o INMETRO usa o termo tendência/recuperação sem mencionar exatidão, já que a veracidade é expressa como a tendência.

A partir da definição da ISO 3534-2 [18] de exatidão, e conforme especificado pelo *Analytical Methods Committee* [26], é facilmente entendido que a exatidão se aplica rigorosamente aos resultados e não aos métodos analíticos, laboratórios ou operadores. Portanto, exatidão denota a ausência de erro de um resultado.

Segundo o VIM, a “exatidão de medição” não é uma grandeza e, portanto, não é atribuído um valor numérico. Uma medição é reconhecida mais exata quando é caracterizada por um erro de medição menor; a “exatidão de medição” é algumas vezes entendida como o grau de concordância entre valores medidos que são atribuídos ao mensurando. No entanto, o termo “exatidão de medição” não deve ser utilizado no lugar de veracidade de medição [20].

Conforme a definição de veracidade dada pela norma ISO 5725 [17], ela é uma característica ou qualidade de um procedimento analítico e não um resultado gerado por este procedimento [8].

A ISO 5725 [17] provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da veracidade e da precisão sendo a veracidade expressa como a tendência.

Segundo a AOAC [16] o termo “exatidão” recebeu tantos significados que é melhor usar um termo mais específico. Normalmente, significa proximidade do resultado do teste com o valor “verdadeiro” ou aceito. Mas o resultado do teste pode ser um valor individual, a média de um conjunto de valores ou a média de muitos conjuntos de valores. Portanto,

sempre que o termo for usado, o número de valores que ele representa e sua relação devem sempre ser declarados, por exemplo, como resultado individual, como a média de duplicatas ou  $n$  réplicas, ou como a média de um conjunto de várias tentativas. A diferença do valor relatado do valor aceito, seja um valor individual, uma média de um conjunto de valores, ou a média de um número de médias, ou um valor atribuído, é a tendência nas condições relatadas. O termo frequentemente usado para tendência ou “exatidão” quando a média de um conjunto de valores é relatado é “veracidade”.

O erro total de medição dos resultados obtidos a partir de um procedimento analítico está relacionado ao grau de concordância entre os valores encontrados, ou seja, os resultados, e o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito. Consequentemente, o erro de medição é a expressão da soma da veracidade (ou tendência) e precisão (ou desvio padrão), ou seja, o erro total [9].

O conceito de veracidade, conforme declarado na ISO 5725, foi criado para abordar algumas objeções filosóficas entre médicos e advogados em relação ao conceito de tendência em estatística [27].

Araújo [5] descreveu que em 2009 o termo exatidão parecia ser o preferido nas revistas científicas. Uma pesquisa realizada pelo autor no site do *Science Direct* usando as palavras-chave “*validation trueness*” e “*validation accuracy*” mostrou que apenas 55 artigos usaram as primeiras palavras-chave, enquanto 3876 usaram as últimas. Repetimos a mesma busca descrita, em 2022, e os resultados foram cerca de 221 artigos com os termos “*validation trueness*” e cerca de 7557 artigos continham o termo “*validation accuracy*”, indicando um aumento de 302 e 95%, respectivamente, dos dois termos em artigos.

### 3.7 Faixa de trabalho / Intervalo

Para qualquer método quantitativo, é necessário determinar a faixa de concentrações de analito ou valores de propriedade sobre os quais o método pode ser aplicado. Os documentos ANVISA e INMETRO se basearam no guia do ICH [6] e suas definições se encontram na tabela 4. Vale ressaltar que ocorre um equívoco no uso do termo exatidão, o qual deveria ser substituído por veracidade, ou aparecer sozinho expressando a soma da precisão e da veracidade.

O VIM [20] cita que o limite inferior de um intervalo de medição não deve ser confundido com limite de detecção.

A IUPAC [19] não recomenda a utilização do termo intervalo, e sim intervalo de medição, o qual define como o intervalo de concentrações entre o limite de medição e a indicação máxima utilizável.

**Tabela 4.** Definição de faixa de trabalho de acordo com as normas brasileiras.

Instituição	Definição
ANVISA	A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e “exatidão”, sendo dependente da aplicação pretendida [4].
INMETRO	Faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, “exatidão” e linearidade [11].
MAPA	Menciona, comenta em diferentes tópicos como linearidade, precisão e veracidade, porém não define como um critério de validação [10].

Segundo o EURACHEM [22], para análises quantitativas a faixa de trabalho do método é avaliada com diferentes concentrações do analito e determinando a faixa de concentrações para a qual a incerteza aceitável pode ser alcançada. Um pré-requisito para realizar a quantificação é estabelecer uma função de calibração para o instrumento de medição. Por esse motivo, pode ser relevante considerar separadamente a faixa de trabalho do método e a faixa de trabalho do instrumento.

A faixa deve ser determinada na fase inicial do desenvolvimento do método e sua seleção é baseada em informações prévias sobre a amostra, em um estudo específico. A faixa escolhida determina o número de padrões usados na construção de uma curva de calibração [8].

O ICH Q2 (R1) [6] assim como a ANVISA [4] recomendam os intervalos mínimos a serem especificados para diversos estudos:

- para o ensaio de um fármaco ou de um produto acabado (fármaco): normalmente de 80 a 120% da concentração de teste;
- para uniformidade de conteúdo, cobrindo um mínimo de 70-130% da concentração de teste, a menos que uma faixa mais ampla e apropriada, com base na natureza da forma farmacêutica (por exemplo, inaladores dosimetrados), seja justificada;
- para teste de dissolução:  $\pm 20\%$  acima da faixa especificada;
- para a determinação de uma impureza: desde o nível reportado de uma impureza até 120% da especificação.

Portanto, a faixa de trabalho são as concentrações ou quantidades sobre as quais o erro total de medição - ou “exatidão” (ISO) - é aceitável. É essencial demonstrar a “exatidão” dos resultados em toda a faixa. Assim, a proposta do documento ICH [6] para realizar seis medições apenas no nível de 100% da concentração de teste para avaliar a precisão do método analítico deve ser usada com precauções para estar de acordo com a definição da faixa. A “exatidão” (ISO) e, portanto, veracidade e precisão devem ser avaliadas experimentalmente e devem ser aceitáveis em toda a faixa para a aplicação do procedimento analítico [8].

### 3.8 Pontuação do grau de concordância com as Definições Padrão

Considerando a concordância plena, parcial e nenhuma concordância em relação às Definições Padrão das características de validação dos três guias oficiais brasileiros, observamos que ANVISA, INMETRO e MAPA tiveram a pontuação de 9 (56,25%), 11 (68,75%) e 11 (68,75%), respectivamente, conforme a tabela 5.

**Tabela 5.** Escore do grau de concordância das normas brasileiras com as definições padrão das características de validação.

Características	ANVISA	INMETRO	MAPA
Seletividade	2	2	2
Função resposta / Curva de calibração	0	0	2
Linearidade	1	1	1
Limite de detecção	2	2	0
Limite de quantificação	1	1	2
Precisão	2	2	2
Exatidão/Veracidade	0	2	2
Faixa de trabalho / Intervalo	1	1	-
Somatório	9	11	11

0 = não concorda; 1 = concorda parcial; 2 = concorda integralmente

Classificando a concordância de forma mais rigorosa, apenas com as possibilidades de concordar ou discordar, os resultados seriam de 37,5, 50 e 62,5%, de concordância para ANVISA, INMETRO e MAPA, respectivamente.

O INMETRO e MAPA obtiveram pontuação (11 e 11) maior que a ANVISA (9), contudo o MAPA ficou com o maior índice de concordância (62,5%), apresentando

maior coerência em relação às Definições Padrão. Já a ANVISA e INMETRO, que possuem a maior parte dos seus guias baseados no ICH obtiveram menores índices de concordância (37,5 e 50%), respectivamente.

As características curva de calibração, linearidade, limite de quantificação, exatidão/veracidade e faixa de trabalho/intervalo foram as que apresentaram definições mais contraditórias, principalmente no que diz respeito à utilização correta do termo exatidão (ISO).

A concordância entre as definições contidas nos três guias entre si foi plena apenas para as características seletividade e precisão e teve as menores concordâncias para as definições de curva de calibração e exatidão.

Laboratórios devem estar atentos aos principais aspectos da validação de métodos aqui discutidos e ter em mente que sua má aplicação vai muito além de uma simples rejeição de um relatório enviado ou um desperdício de dinheiro, tempo e recursos. A aceitação e aplicação de terminologia errônea pode ter sérias implicações na confiabilidade dos resultados, no desempenho do laboratório e na credibilidade da instituição [5].

## CONCLUSÕES

A acreditação de laboratórios pelo Cgcre do INMETRO na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 interconecta as áreas da saúde humana, saúde animal e meio ambiente, entre outras.

Atualmente o conceito Uma Saúde (*One Health*) reconhece que a saúde dos seres humanos, animais, plantas e o ambiente estão interconectados e interdependentes. Esta ideia foi moldada ao longo dos séculos e ganhou impulso nos últimos 15 anos.

É importante ter definições inequívocas e cientificamente fundamentadas para as diferentes características de validação e empregar a metodologia estatística apropriada na avaliação destas definições.

O reposicionamento das definições e metodologias durante os processos de revisão de documentos regulatórios para eliminar requisitos e definições contraditórias, às vezes cientificamente irrelevantes, deve ser recomendado e implementado.

Foram demonstradas diferenças entre algumas características de validação descritas nas três normas oficiais avaliadas, sendo desejável uma harmonização entre elas para evitar discrepâncias entre os setores regulados pelos diferentes órgãos no país.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. K.T. Patel, N.P. Chotai, Pharmaceutical GMP: Past, present, and future – A review, *Die Pharmazie*, **63**, 251–255 (2007).
2. S.K. Jain, R.K. Jain, Evolution of GMP in pharmaceutical industry, *Res. J. Pharm. Tech.*, **10**(2), 501–506 (2017).
3. B.L. Clarke, Symposium on Statistical Methods in Experimental and Industrial Chemistry. Introductory remarks, *Anal. Chem.*, **19**(12), 943 (1947).
4. Brasil, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017, nº 141.
5. P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**(23), 2224–2234 (2009).
6. International Conference on Harmonization (ICH), Harmonised Tripartite Guidelines, *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)*, Genebra, Suíça, 2005.
7. P.H. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal -- Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**(3), 579–586 (2004).
8. E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation, *J. Chromatogr. A*, **1158**(1-2), 111–125 (2007).
9. J.L.S. Possas, J.E. dos Santos, M.C. Nascimento, P.A. dos Santos, D.W.C. Anjos, W.C. Moura, Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de um ensaio imunoenzimático, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **71**(4), 691–705 (2012).

10. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), *Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários*, MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2011. 72 p.
11. Brasil, Ministério da Economia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), *Orientação sobre validação de métodos analíticos*, DOQ-CGCRE-008, 2020. rev. 8.
12. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, *NBR ISO/IEC 17025:2017: Requisitos gerais para competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração*, Rio de Janeiro, 2017.
13. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde – Reblas, 2022. URL: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/laboratorios/reblas>, consultado em dezembro de 2022.
14. Brasil, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 390, de 26 de maio de 2020: Estabelece critérios, requisitos e procedimentos para o funcionamento, a habilitação na Reblas e o credenciamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária e dá outras providências, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2020, nº 101.
15. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), *Credenciamento de Laboratório na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do MAPA*, 2022. URL: <https://www.gov.br/pt-br/servicos/credenciar-laboratorio-na-rede-nacional-de-laboratorios-agropecuarios-do-mapa>, consultado em dezembro de 2022.
16. AOAC International, *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, Int 95, 2002.
17. ISO 5725, *Application of the Statistics-Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement - Parts 1 to 6*, International Organization for Standardization (ISO), 2003.
18. ISO 3534-2: *Statistics - Vocabulary and Symbols*, International Organization for Standardization (ISO), 2006.
19. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), *Compendium of Chemical Terminology*, Gold Book, Version 2.3.2., 2012. 1622 p.

20. Brasil, Ministério da Economia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), *Vocabulário Internacional de Metrologia, Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associado*, Luso-Brasileira do VIM, 2012.
21. EURACHEM/CITAC, *Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*, V. Barwick (editor), 3rd ed., 2016.
22. EURACHEM GUIDE, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed., 2014.
23. B. Persson, J. Vessman, Generating selectivity in analytical chemistry to reach the ultimate -specificity, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **17**(3), 117–119 (1998).
24. P. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, The SFSTP Guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: From the Washington Conference to the Laboratory, *Anal. Chim. Acta*, **391**, 135–148 (1999).
25. B. Boulanger, P. Chiap, W. Dewé, J. Crommen, P.H. Hubert, An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**(4-5), 753–765 (2003).
26. AMC - Analytical Methods Committee, Technical Brief 13, Royal Society of Chemistry, London, 2003. URL: <http://www.rsc.org/Membership/Networking/InterestGroups/Analytical/AMC/TechnicalBriefs.asp>, consultado em setembro de 2022.
27. W.W. Hauck, W.F. Koch, D.R. Abernethy, R.L. Williams, Making sense of trueness, precision, accuracy, and uncertainty, *Pharmaceutical Forum*, **34**(3), 838–842 (2008).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

D.H. Vieira, W.C. Moreira, L. Ribeiro-Seródio, O.A. França-Presgrave, B. Dallagiovanna, W. Corrêa de Moura, Análise crítica de três guias Oficiais de Validação de Métodos Analíticos em vigor no Brasil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 658-680 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106421>



## Adesão à terapia farmacológica de pacientes diabéticos e o grau de conhecimento sobre a doença

Larissa Holanda Assunção Lima<sup>1</sup>, Débora Priscyla Gigante de Sousa<sup>1</sup>, Ergellis Victor Cavalcanti de Lima<sup>1</sup>, Gabriel Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Letícia Holanda Assunção<sup>2</sup>, Guilherme Martins Gomes Fontoura<sup>3,4</sup>, Leonardo Hunaldo dos Santos<sup>4,5</sup>, Luecyia Alves de Carvalho Silva<sup>1</sup>, Aramys Silva Reis<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Centro de Ciências de Imperatriz, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Centro Universitário do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos, Bragança, Pará, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Centro de Ciências de Imperatriz, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

<sup>5</sup>Curso de Licenciatura em Ciências Naturais, Centro de Ciências de Imperatriz, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

\*Autor correspondente: aramys.reis@ufma.br

Recebido: 27 de janeiro de 2022

Revisado: 28 de fevereiro de 2023

Aceto: 3 de março de 2023

### RESUMO

**Objetivo:** avaliar a adesão à terapia farmacológica por pacientes diabéticos e o grau de conhecimento que estes possuem sobre a doença uma unidade básica de saúde do município de Imperatriz, Maranhão. **Métodos:** foi realizado um estudo transversal realizado com 179 pacientes com diagnóstico de diabetes e em tratamento farmacológico. Para coleta dos dados utilizou-se dois questionários validados: Teste de Morisky e Green e *Diabetes Knowledge Scale* (DKN-A). **Resultados:** do total de pacientes entrevistados, 58,7% apresentam adesão imperfeita, sendo 32,4% caracterizados como do tipo não intencional. Além disso, 67,6% apresentam grau de conhecimento insuficiente sobre a doença. Em adição, foi verificado que sexo feminino, idade igual ou maior que 60 anos, viver sem companheiro ou menor nível de escolaridade são fatores relacionados a um menor grau de conhecimento. **Conclusões:** os achados reforçam a necessidade de ações educativas inter-

disciplinares que envolvam aspectos socioeconômicos, psicoemocionais e educacionais de modo a abranger os fatores extrínsecos e intrínsecos que interferem no processo de adesão ao plano terapêutico e controle da doença, promovendo assim, uma atenção integral e maior qualidade de vida para os usuários.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus, adesão terapêutica, conhecimento.

## SUMMARY

### Adhesion to pharmacological therapy of diabetic patients and the level of knowledge about the disease

**Aim:** To evaluate the adherence to pharmacological therapy of diabetic patients and the degree of knowledge that they have about the disease through a cross-sectional study of 179 patients from a Basic Health Unit in the city of Imperatriz-MA.

**Methods:** To collect the data, were used Morisky's and Green's Test and Diabetes Knowledge Scale (DKN-A), that are validated questionnaires. Of all patients interviewed, 58.7% had imperfect adherence, 32.4% were characterized as of the unintentional type and 67.6% had insufficient knowledge about the disease. **Results:** After data analysis was detected correlation of the degree of knowledge with sex, age, marital status and education, being sex female, age equal to or greater than 60 years old, living without a partner and low level of education, factors related to a lower degree of knowledge. **Conclusions:** The findings reinforce the necessity for interdisciplinary educational actions that involve socio-economic, psychoemotional and educational aspects in order to know the extrinsic and intrinsic factors that interfere in the control of the disease and that guide the process of adherence to the therapeutic plan, an integral attention and greater quality of life for the users.

**Keywords:** Diabetes mellitus, therapeutic adherence, knowledge.

## RESUMEN

### Adherencia a la terapia farmacológica en pacientes diabéticos y el grado de conocimiento sobre la enfermedad

**Objetivo:** evaluar la adherencia a la terapia farmacológica de los pacientes diabéticos y el grado de conocimiento que tienen sobre la enfermedad en una unidad básica

de salud en la ciudad de Imperatriz, Maranhão. **Métodos:** se realizó un estudio transversal con 179 pacientes diagnosticados de diabetes y en tratamiento farmacológico. Para la recolección de datos, se utilizaron dos cuestionarios validados: Morisky and Green Test y Diabetes Knowledge Scale (DKN-A). **Resultados:** del total de pacientes entrevistados, el 58,7% presentó adherencia imperfecta, siendo el 32,4% caracterizado como no intencional. Además, el 67,6% tiene un grado de conocimiento insuficiente sobre la enfermedad. Además, se encontró que el género femenino, la edad igual o mayor a 60 años, vivir sin pareja o un menor nivel educativo son factores relacionados con un menor nivel de conocimiento. **Conclusiones:** los hallazgos refuerzan la necesidad de acciones educativas interdisciplinarias que involucren aspectos socioeconómicos, psicoemocionales y educativos con el fin de abarcar los factores extrínsecos e intrínsecos que interfieren en el proceso de adhesión al plan terapéutico y control de la enfermedad, promoviendo así una atención integral y una mejor calidad de vida para los usuarios.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus, adherencia terapéutica, conocimiento.

## INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome cada vez mais presente na população mundial, configurando-se como um importante e crescente problema de saúde pública [1]. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, a prevalência de diabetes tem aumentado a cada ano. Em 2017, cerca de 8,8% da população mundial, entre 20 e 79 anos, possuía essa doença [1-3]. Esse aumento está associado a fatores como envelhecimento populacional e maior sobrevivência dos indivíduos com diabetes [1]. O DM tem como principal característica altos níveis de glicose circulantes no sangue, decorrentes de defeitos na produção e/ou secreção de insulina. Essa condição pode gerar sérios problemas de saúde, tais como: cicatrização deficiente, gangrena de órgãos, sobrecarga e falência renal, problemas circulatórios, retinopatia, coma e, conseqüentemente, a morte [4, 5].

O tratamento medicamentoso representa uma das principais estratégias para o controle individual de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) [6], a exemplo do DM. Contudo, esta estratégia tem se tornado cada vez mais complexa no decorrer dos anos. A incorporação de novas classes terapêuticas e uma associação com atividades de autocuidado têm requerido uma mudança de hábitos por parte do paciente visando proporcionar um estilo de vida mais saudável e com maior qualidade [1].

Para que o tratamento seja efetivo, promovendo controle da doença, é fundamental uma adequada adesão à terapia prescrita. Entretanto, segundo a Organização Mundial

de Saúde (OMS), em países desenvolvidos, a não adesão às terapias de doenças crônicas gira em torno de 50%, sendo este valor superior em países não desenvolvidos [6]. No cenário brasileiro, contudo, faltam evidências sobre a adesão em portadores de doenças crônicas a partir de estudos com representatividade nacional [7].

Por se tratar de um fenômeno multidimensional, a adesão à terapia farmacológica manifesta-se de forma diferente entre os diversos grupos populacionais, conforme condições socioeconômicas, sistema de saúde, grau de incapacidade do paciente, existência de comorbidades associadas, organização dos serviços assistenciais e grau de conhecimento que o paciente possui sobre a doença [6, 8].

A adesão à terapia farmacológica pode ser avaliada por diferentes instrumentos. Destes, a escala de Morisky-Green é uma das mais utilizadas para avaliar a adesão à medicação. Suas vantagens estão associadas à simplicidade de aplicação; seu escopo, que avalia não apenas a adesão à medicação, mas também fatores comportamentais e motivacionais que podem afetar a adesão do paciente; sua precisão e consistência, além do baixo custo [9].

Ademais, tem sido proposto que o conhecimento sobre a doença consiste num fator que contribui para a maior adesão à terapia farmacológica e não farmacológica. O esclarecimento sobre as diversas complicações e consequências do DM pode servir de incentivo à atitude de autocuidado por parte do paciente [10]. Neste sentido, a *Diabetes Knowledge Scale* é amplamente utilizada em estudos clínicos e de pesquisa para avaliar o conhecimento de pacientes sobre sua doença, e a eficácia de intervenções educativas em pacientes com diabetes. Com base nos resultados obtidos, é possível identificar lacunas no conhecimento dos pacientes e desenvolver estratégias eficazes para melhorar a gestão do diabetes e prevenir complicações [11].

Assim, compreender as variáveis que influenciam a adesão ao tratamento medicamentoso e identificar o nível de conhecimento sobre a doença representa um dos pilares que fundamentam o planejamento de intervenções educativas. Além disso, uma educação em DM, quando é ajustada ao contexto socioeconômico e cultural dos pacientes, proporciona melhores resultados [10]. Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a adesão à terapia farmacológica em pacientes diabéticos, o grau de conhecimento que possuem sobre a doença e os fatores associados.

## MÉTODOS

o estudo foi realizado na cidade de Imperatriz, localizada ao sudoeste do Estado do Maranhão. Conforme o censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

(IBGE), o município possui 1.368,987 km<sup>2</sup> com uma população de 247.505 habitantes, onde a maioria (94,8%) vive em área urbana [12].

A pesquisa foi constituída de um estudo transversal, quantitativo e analítico com pacientes com diagnóstico de diabetes e cadastrados na Unidade Básica de Saúde (UBS) Milton Lopes, através do sistema e-SUS. A UBS Milton Lopes fornece realização de exames laboratoriais, consultas com clínico geral, ginecologista e atenção domiciliar (*home care*), além de abrigar três equipes de Estratégia de Saúde da Família (ESF). Na data do estudo havia 331 pacientes cadastrados com diagnóstico de DM. Para a pesquisa foram recrutados 179 pacientes. O cálculo amostral foi realizado por meio fórmula:  $n = N \times n_0 / N + n_0$ , sendo que  $n_0 = 1/E_0^2$ , em que N= 331 (tamanho da população); E<sub>0</sub>= 5% (erro amostral tolerável); n<sub>0</sub>= (primeira aproximação do tamanho da amostra) e n= tamanho da amostra.

Os participantes foram selecionados aleatoriamente dentre os pacientes diagnosticados com DM cadastrados na UBS Milton Lopes e foram realizados contatos a fim de verificar o interesse em participarem da pesquisa. Todos os pacientes selecionados concordaram em participar. Foram excluídos os pacientes menores de 18 anos e/ou que possuíam dificuldades cognitivas que os impediam de compreender e de responder ao questionário.

O estudo observou as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão no dia 22 de março de 2018 (Plataforma Brasil: CAAE nº 82702718.2.0000.5087, parecer nº 2.558.525, em 30 de agosto de 2017). Todos os participantes da pesquisa assinaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do qual receberam uma cópia.

A coleta dos dados foi realizada entre julho de 2018 e janeiro de 2019 através da aplicação de um questionário semiestruturado feito individualmente na residência de cada participante. Através do questionário foi avaliado o perfil sociodemográfico e clínico, a adesão ao tratamento medicamentoso e o grau de conhecimento do paciente sobre o DM.

Para a investigação sociodemográfica, foram analisadas as variáveis sexo, idade, etnia, situação conjugal, tempo de escolaridade e renda. Clinicamente, foi analisada a coexistência de outra doença, o uso de insulina, a quantidade de medicamentos usada no tratamento, o tempo de tratamento e a dependência ou não de ajuda para realizar o tratamento. Para a melhor interpretação dos dados descritivos, a idade foi categorizada entre 40 e 59 anos (40 a 59) e maiores de 60 anos, tal como havia sido feito em um estudo de análise do grau de adesão ao tratamento medicamentoso, tendo sido acrescentada a categoria de menores de 40 anos (<40) para englobar toda a amostra do pre-

sente estudo. Por sua vez, a etnia foi categorizada em negra/parda, branca e amarela; a situação conjugal em: com e sem companheiro; tempo de escolaridade em: 0, 1 a 9 anos e 10 a 12 anos; e renda em <2 e >2 salários mínimos. As variáveis clínicas incluíram coexistência de outra doença, uso de insulina, o tipo de terapia em relação à quantidade de medicamentos (mono, bi ou tri), tempo de tratamento (<5 anos, 5 a 10 anos e >10 anos) e a dependência ou não de ajuda para realizar o tratamento.

Para avaliar a adesão ao tratamento farmacológico foi utilizado o teste de adesão de Morisky e Green. O teste é composto por quatro perguntas objetivas: 1- *Você alguma vez se esqueceu de tomar o seu remédio?* 2- *Você, às vezes, é descuidado com os horários de tomar o seu remédio?* 3- *Quando você se sente bem, alguma vez, deixa de tomar o seu remédio?* e 4- *Quando você se sente mal com o remédio, você, às vezes, deixa de tomá-lo?* A cada resposta “sim” atribui-se a pontuação zero, e a cada resposta “não” atribui-se a pontuação um. A avaliação da escala é classificada em níveis de adesão: alta adesão (score = 4, se o paciente respondeu “não” a todas as perguntas); média adesão (score = 3 ou 2, se o paciente respondeu “sim” a uma ou duas questões respectivamente) e baixa adesão (score = 1 ou 0, se o paciente respondeu “sim” a três ou a quatro questões, respectivamente). Além disso, pode-se analisar a adesão como uma variável dicotômica: perfeita adesão (score = 4) e adesão imperfeita (score < 4) [8, 9]. Este estudo realizou os dois tipos de classificações, embora para a análise estatística tenha se utilizado da classificação de adesão perfeita e imperfeita.

Ademais, foi avaliado se o comportamento de adesão imperfeita foi do tipo intencional ou não intencional, sendo também possível caracterizar pacientes portadores de ambos os tipos de comportamento de adesão imperfeita. Para os que apresentaram uma resposta “sim”, em qualquer uma das duas primeiras perguntas, o tipo de adesão imperfeita foi classificado como do tipo não intencional; e para resposta “sim”, em qualquer uma das duas últimas perguntas, foi classificado como do tipo intencional. Para resposta “sim” presente em uma das duas primeiras e uma das duas segundas, foi classificado como do tipo misto [8, 9].

O grau de conhecimento foi avaliado por meio da versão traduzida para a língua portuguesa e validada no Brasil do *Diabetes Knowledge Scale* (DKN-A), um questionário composto de quinze questões de múltipla escolha sobre diferentes aspectos relacionados ao conhecimento geral sobre o DM. O questionário é dividido em cinco categorias: (1) fisiologia básica, incluindo a ação da insulina; (2) hipoglicemia; (3) grupos de alimentos e suas substituições; (4) gerenciamento de DM na intercorrência de alguma outra doença; e (5) princípios gerais dos cuidados da doença. A escala de medida é de 0-15, sendo que cada resposta correta é medida com score (1), e, cada incorreta com score (0). Além disso, os itens de 1 a 12 possuem uma resposta correta, enquanto os

itens de 13 a 15 possuem mais de uma alternativa correta e todas devem ser conferidas para obter o escore (1). Ao final, um escore igual ou maior a oito indica o maior conhecimento sobre DM [11].

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados específico criado no programa Microsoft Excel versão 2016. Após a verificação de erros e inconsistências, a análise estatística dos dados foi realizada no programa IBM SPSS, versão 24. A princípio, realizaram-se análises descritivas por meio de frequências relativas e absolutas das características sociodemográficas e clínicas. Para avaliar as possíveis associações entre as variáveis, foram utilizados testes de *Qui-quadrado*, *Exato de Fisher* ou de *Fisher-Freeman-Halton* [13]. Todos os testes foram realizados a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

As características socioeconômicas e clínicas dos 179 pacientes diabéticos entrevistados estão descritas na Tabela 1 e mostram que 69,3% eram do sexo feminino. Quanto à idade, 26,3% tinham entre 40 e 59 anos e 72,1% possuíam 60 anos ou mais. Pacientes autodeclarados negros ou pardos corresponderam a 49,7% e 53,6% viviam com companheiro. Além disso, 48,6% estudaram de 1 a 9 anos e, somente, 8,9% tinham mais de 12 anos de estudo. Em adição, 77,7% dos pacientes possuem renda familiar inferior a dois salários-mínimos.

Dos pacientes entrevistados, 76,5% relataram possuir alguma comorbidade além do DM. Destes, 85,4% afirmaram ser hipertensos. Outras situações comuns incluíam dislipidemia e osteoporose. Em adição, 56,4% declararam que fazem uso de dois ou três medicamentos para o DM, sendo que 78,2% não fazem uso de insulina. O tratamento farmacológico já é realizado há mais de 10 anos em 49,2% dos casos. Ademais, foi constatado que 82,1% não necessitam de ajuda para realizarem o tratamento medicamentoso.

**Tabela 1.** Características socioeconômicas e clínicas dos pacientes diabéticos cadastrados na UBS Milton Lopes de Imperatriz-MA.

		n	%
Sexo	Feminino	124	69,3
	Masculino	55	30,7
Idade	<40	3	1,7
	40 a 59	47	26,3
	≥60	129	72,1

(Continue)

		n	%
Etnia	Negro/Pardo	89	49,7
	Branca	87	48,6
	Amarelo	3	1,7
Situação conjugal	Com companheiro(a)	96	53,6
	Sem companheiro(a)	83	46,4
Escolaridade (anos)	0	38	21,2
	1 a 9	87	48,6
	10 a 12	38	21,2
	> 12	16	8,9
Renda	<2	139	77,7
	>2	40	22,3
Outras doenças	Não	42	23,5
	Sim	137	76,5
Uso de insulina	Não	140	78,2
	Sim	39	21,8
Tipo de terapia	Mono	78	43,6
	Bi/tri	101	56,4
Tempo de tratamento	<5	31	17,3
	5 a 10	60	33,5
	>10	88	49,2
Cuidado	Ajuda	32	17,9
	Sozinho	147	82,1

No que diz respeito à adesão à terapia farmacológica (Tabela 2), 41,3% apresentaram alta adesão, 49,6% média adesão e 8,9 % baixa adesão. Partindo de outra análise, foi verificado que 58,7% possuíam adesão imperfeita e 41,3% adesão perfeita. Entre os pacientes que tiveram uma adesão imperfeita, 7,2% foi caracterizada como intencional, 32,4% como não intencional e 18,9% como comportamento misto.

**Tabela 2.** Grau de adesão ao tratamento farmacológico e classificação do tipo de adesão imperfeita

Escala de Morisky e Green		
	n	%
Adesão Perfeita	74	41,3
Adesão Imperfeita	105	58,7
Classificação da adesão Imperfeita		
	n	%
Intencional	13	7,2%
Não intencional	58	32,4%
Ambos os tipos de comportamento	34	18,9%



A avaliação geral do conhecimento evidenciou que 67,6% dos pacientes apresentaram um conhecimento insatisfatório e, apenas 32,4% conseguiram alcançar pontuação maior ou igual a oito pontos, indicando um conhecimento satisfatório. A questão com menor número acertos (7,8%) foi quanto a “*substituições do pão francês por outras fontes de carboidrato*”. Por outro lado, o questionamento se “*o controle malfeito do DM poderia resultar em uma chance maior de complicações posteriores, associadas à doença*”, foi o que gerou maior número de acertos (86,0%) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Proporção de acertos, erros e não soube informar dos itens relacionados ao conhecimento sobre o diabetes, respondido pelos pacientes cadastrados na UBS Milton Lopes de Imperatriz- MA.

Questões (n= 15)	Acertos n (%)	Erros/ Não sabe n (%)
1. No diabetes sem controle, o açúcar no sangue é alto	117 (65,4%)	62 (34,6%)
2. O controle mal feito do diabetes pode resultar numa chance maior de complicações mais tarde	154 (86%)	25 (14%)
3. A faixa de variação normal da glicose no sangue é de 70-110 mg/dL	105 (58,6%)	74 (41,34%)
4. A manteiga é composta principalmente de gordura	108 (60,3%)	71 (39,6%)
5. O arroz é composto principalmente de carboidratos	105 (58,6%)	74 (41,34%)
6. A presença de cetonas na urina é um mau sinal	43 (24,0%)	136 (76,0%)
7. Alterações nos pulmões geralmente não estão associadas ao diabetes	66 (36,8%)	113 (63,1%)
8. Se uma pessoa que está tomando insulina apresenta uma taxa alta de açúcar no sangue ou na urina, assim como presença de cetonas ela deve manter a mesma quantidade de insulina e a mesma dieta, fazer um exame de sangue e de urina	29 (16,2%)	150 (83,8%)
9. Se uma pessoa com diabetes está tomando insulina e fica doente ou não consegue comer a dieta receitada ela deve usar hipoglicemiante oral para diabetes em vez da insulina	60 (33,5%)	119 (66,5%)
10. Se a hipoglicemia está começando deve-se comer ou beber algo doce imediatamente	97 (54,2%)	82 (45,8%)
11. A pessoa com diabetes pode comer o quanto quiser de alface e agrião	126 (70,4%)	53 (29,6%)
12. A hipoglicemia é causada pelo excesso de insulina	31 (17,3%)	148 (82,7%)
13. 1 kg corresponde a uma unidade de peso e igual a 1000 gramas	47 26,2%)	132 (73,7%)

Questões (n= 15)	Acertos n (%)	Erros/ Não sabe n (%)
14. 1 pão francês é igual a 4 biscoitos de água e sal; 1 ovo é igual a 1 porção de carne moída	20 (11,2%)	159 (88,8%)
15. Substituição do pão francês por 4 biscoitos de água e sal ou 2 pães de queijo médios	14 (7,8%)	165 (92,2%)

Interessantemente, não foi evidenciada a correlação entre o grau de adesão ao tratamento e as variáveis socioeconômicas analisadas. Por outro lado, foi verificada a correlação entre o grau de conhecimento e o sexo ( $p < 0,001$ ), a faixa etária ( $p < 0,001$ ), a situação conjugal ( $p = 0,002$ ) e a escolaridade ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4). Entre os pacientes do sexo feminino, 76,6% apresentaram conhecimento insatisfatório, ao passo que essa característica só foi observada em 47,3% dos homens.

O maior percentual de pacientes com conhecimento insatisfatório em relação à doença também foi observado entre aqueles que relataram não possuir companheiro conjugal (77,1%) ou que não tinham baixa escolaridade (analfabetos – 100% ou de 1 a 9 anos de estudos – 70,1%). Quanto às faixas etárias analisadas, entre aqueles que possuíam entre 40 e 59 anos, um grau de conhecimento satisfatório foi prevalente (53,3%), enquanto que nas outras faixas etárias verificou-se o menor percentual de pacientes com grau de conhecimento satisfatório (<40=33,3% e  $\geq 60=24,8\%$ ).

Não foi encontrada nenhuma correlação entre o grau de adesão e as variáveis clínicas, o que também ocorreu quando comparados o grau de conhecimento e as variáveis clínicas. Além disso, não houve correlação entre o grau de adesão e o grau de conhecimento (Tabela 5).

**Tabela 4.** Correlação da adesão ao tratamento farmacológico e do grau de conhecimento com as variáveis socioeconômicas.

	Morisky e Green (Adesão)						p	Conhecimento						p
	Imperfeita			Perfeita				Insatisfatório			Satisfatório			
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
Sexo*	Feminino	73	58,9	51	41,1	0,93*	95	76,6	29	23,4	<0,001*			
	Masculino	32	58,2	23	41,8		26	47,3	29	52,7				
Faixa etária	<40	2	66,7	1	33,3	0,89*	2	66,7	1	33,3	<0,001**			
	40 a 59	29	61,7	18	38,3		22	46,8	25	53,2				
	≥60	74	57,4	55	42,6		97	75,2	32	24,8				
Etnia	Negro/Pardo	58	65,2	31	34,8	0,17*	60	67,4	29	32,6	0,41**			
	Branca	46	52,9	41	47,1		60	69,0	27	31,0				
	Amarelo	1	33,3	2	66,7		1	33,3	2	66,7				
Situação Conjugal	Com companheiro(a)	61	63,5	35	36,5	0,17*	57	59,4	39	40,6	0,002*			
	Sem companheiro(a)	44	53,0	39	47,0		64	77,1	19	22,9				
	0	24	63,2	14	36,8		38	100,0	0	0,0				
Escolaridade (anos)	1 a 9	49	56,3	38	43,7	0,91	61	70,1	26	29,9	<0,01**			
	10 a 12	23	60,5	15	39,5		15	39,5	23	60,5				
	> 12	9	56,3	7	43,8		7	43,8	9	56,3				
Renda	<2	86	61,9	53	38,1	0,14**	99	71,2	40	28,8	0,06*			
	>2	19	47,5	21	56,8		22	55,0	18	45,0				

\*Teste de Qui-quadrado. \*\*Teste de Fisher-Freeman-Halton.

**Tabela 5.** Correlação da adesão ao tratamento farmacológico e do grau de conhecimento com as variáveis clínicas.

	Imperfeita			Morisky e Green (Adesão)			Insatisfatório			Satisfatório			p
	n	%		n	%		n	%		n	%		
		Perfeita			Perfeita			Insatisfatório			Satisfatório		
Outras doenças	Sim	83	60,6	54	39,4	0,37*	28	14	33,3	66,7	14	0,88*	
	Não	22	52,4	20	47,6		93	44	32,1	67,9	44		
	Não	84	60,0	56	40,0	0,49*	96	44	31,4	68,6	44	0,60*	
Uso de insulina	Sim	21	53,8	18	46,2		25	14	35,9	64,1	14		
	Mono	44	56,4	34	43,6	0,09**	48	30	38,5	61,5	30	0,13*	
	Bi/tri	61	60,4	40	39,6		73	28	27,7	72,3	28		
Tempo de Tratamento	<5	18	58,1	13	41,9		20	11	35,5	64,5	11		
	5 a 10	38	63,3	22	36,7	0,65***	40	20	33,3	66,7	20	0,87*	
	>10	49	55,7	39	44,3		61	27	30,7	69,3	27		
Cuidado	Sozinho	91	61,9	56	38,1	0,06*	25	7	21,9	78,1	7	0,16*	
	Ajuda	14	43,8	18	56		96	51	34,7	65,3	51		
Conhecimento	Insatisfatório	66	54,5	55	45,5	0,14*							
	Satisfatório	39	67,2	19	32,8								

\*Teste de Qui-Quadrado. \*\*Teste Exato de Fisher. \*\*\*Teste de Fisher-Freeman-Halton.

## DISCUSSÃO

A adesão do paciente ao tratamento medicamentoso prescrito, bem como o grau de conhecimento sobre sua enfermidade, é de suma importância para o controle adequado do diabetes, podendo ser influenciado por diversos fatores sociodemográficos e clínicos [5, 7]. Neste estudo investigamos a relação entre a adesão ao tratamento farmacológico e o grau de conhecimento sobre o DM com as condições sociais, econômicas e clínicas de pacientes com diagnóstico de DM, atendidos pela Estratégia de Saúde da Família de um município do Estado do Maranhão, Brasil. Os resultados do estudo indicam uma maior prevalência de uma adesão imperfeita (58,7%), compatível com outros estudos que utilizaram o mesmo método de quantificação para a adesão à terapia farmacológica de uso contínuo em outras populações [14-16]. Tal fato elucida a necessidade de maior supervisão dos pacientes pelos profissionais de saúde, visto que mais da metade não realizou um tratamento adequado, encontra-se, portanto, sujeita ao descontrole da doença e ao maior risco de complicações e de mortalidade [16, 17].

Em relação ao conhecimento, observou-se que o grau insuficiente foi prevalente (67,6%). Dentre as questões avaliadas, identificou-se maior acerto para a afirmação de que o controle malfeito da diabetes pode resultar numa chance maior de complicações posteriores, e menor, para a substituição do pão francês. Outro achado relevante consiste no fato de que 82,7% dos entrevistados não sabem identificar as causas de uma hipoglicemia e quase metade dos pacientes (45,8%) não sabe como proceder em caso de uma crise de hipoglicemia começar, característica identificada por outro estudo realizado no Brasil [18]. Contudo, este achado mostra-se alarmante, tendo em vista que a maioria dos pacientes entrevistados é idosa e possui maior risco para a hipoglicemia devido ao comprometimento da função renal e alteração no metabolismo dos medicamentos [2, 18]. Assim, é necessário a promoção de maior informação acerca das substituições alimentares, prevenção e tratamento de hipoglicemia [2, 10, 18].

Quanto às variáveis associadas, a idade acima de 60 anos obteve os maiores índices de conhecimento insuficiente sobre o DM, em consonância com resultados encontrados em estudos realizados no Brasil e na Etiópia [18, 19], este último, ainda relata que há uma diminuição significativa do conhecimento com o aumento a cada 1 ano na idade [19]. Isto pode estar relacionado com a baixa escolaridade, pois pode refletir a dificuldade de acesso à educação no passado, sobretudo, dentre os idosos que buscam os serviços de saúde pública [18, 20]. Portanto, é imprescindível a conscientização dos profissionais de saúde quanto à clareza das orientações e informações dadas aos pacientes sobre a doença e o tratamento. No entanto, um paradoxo a esse raciocínio reside no fato de que os pacientes com menos de 40 anos possuem conhecimento menor do que

os pacientes com 40 a 59 anos, o que, possivelmente, teria relação com o grau de aceitação da doença, tempo de tratamento e complicações, os quais seriam menores entre os pacientes mais jovens.

Nessa linha de raciocínio, destaca-se a associação encontrada entre o conhecimento satisfatório e o tempo de escolaridade, sendo nitidamente maior entre os pacientes com mais de 10 anos de escolaridade. Outros estudos nessa área indicam que, no diabetes, o nível instrucional é um fator de proteção por estar relacionado à busca e ao aproveitamento de informações e serviços de saúde [21]. Além disso, o baixo nível de escolaridade pode restringir o acesso às informações, devido à ausência ou dificuldade não apenas de leitura, escrita e fala, assim como de capacidade de compreensão da doença, tratamento e prescrição médica [10, 18, 20].

O estudo também demonstrou uma associação do grau de conhecimento insuficiente e o sexo feminino. Tal relação é contraditória ao senso comum de que a mulher se cuidaria mais, todavia, um estudo realizado na França, constatou que a mulher apresenta um sentimento de revolta, insatisfação com a doença, baixa motivação e dificuldade para o autocuidado, enquanto o homem se responsabiliza por sua doença, não a encara como um fardo e consegue lidar melhor com os aspectos emocionais [18, 21]. Dessa forma, tais sentimentos poderiam influenciar diretamente na busca pelo conhecimento sobre a doença.

Outra associação encontrada refere-se ao conhecimento e a situação conjugal dos pacientes, de modo que a maior porcentagem de conhecimento satisfatório se encontra dentre os entrevistados que vivem com algum companheiro. Isto conflui com os resultados de um estudo que analisou a influência de fatores de proteção e de risco na adesão ao tratamento de DM, no qual, a família, ou seja, o fato de ter alguém, configura-se como um fator de proteção, proporcionando cuidado direto e indireto e ampliando a taxa de adesão [22]. Neste estudo, dentre os pacientes com adesão imperfeita observou-se que o comportamento não intencional foi prevalente, indicando que se esquecer de tomar o remédio e/ou ser descuidado com os horários são os principais fatores envolvidos na adesão imperfeita. Em virtude disso, o auxílio de uma rede de apoio, sendo esta a família, cônjuge, amigos ou vizinhos, ajudaria a melhorar a adesão do paciente [8].

Em contrapartida, não foi encontrada nenhuma correlação entre o grau de adesão ao tratamento e as variáveis socioeconômicas e clínicas dos pacientes, nem mesmo com o grau de conhecimento, em desacordo com outros estudos que mostram associações com a renda, a escolaridade, o tempo de doença, o tipo de terapia, a presença de outras comorbidades e o grau de conhecimento [15, 20]. Em face disso, mais estudos devem

ser realizados para entender o perfil encontrado, o qual pode estar relacionado a uma característica específica da região estudada ou ao relato incorreto por parte do paciente.

Portanto, a adesão farmacológica imperfeita e o conhecimento insuficiente configuraram-se como maioria neste estudo, reforçando a importância do tema e a necessidade da abordagem profissional em relação a esse comportamento a fim de melhorar a assistência oferecida nos serviços de saúde [10]. Assim, no planejamento e na realização das ações de saúde, os profissionais precisam não só estimular a autonomia e considerar os fatores psicoemocionais, como a expressão de sentimentos para a maior identificação e superação das dificuldades do tratamento impostas no cotidiano dos pacientes, bem como promover ações que compartilhem e incentivem a busca pelo conhecimento do DM, respeitando as variáveis escolaridade e tempo de doença dos pacientes [18, 23].

Este estudo possui algumas limitações. Primeiramente foi utilizado apenas um serviço de saúde como referência, sendo interessante uma ampliação dos locais de coleta, buscar uma maior diversidade dos participantes. Além disso, apesar de válidos e apresentarem muitas vantagens os instrumentos de avaliação possuem limitações. Estas estão especialmente relacionadas ao fato de dependerem da capacidade de autorrelato do paciente; focam apenas em comportamentos específicos à adesão farmacológica; e possuem limitações linguísticas e culturais. Para superar essas limitações, seria interessante utilizar instrumentos adicionais que não dependam apenas do autorrelato do paciente e que abordem outros aspectos da adesão ao tratamento.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados fornecem subsídios importantes para a avaliação da prática clínica para a prestação de cuidados a pessoas diabéticas, tendo assim relevância no cenário da saúde pública, pois apresenta fatores extrínsecos e intrínsecos que interferem no controle da doença. Desse modo, evidencia a necessidade de planejamento de ações educativas, de caráter interdisciplinar, considerando aspectos cognitivos, socioeconômicos e psicoemocionais.

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Finance Code 001). Agradecemos à equipe da Estratégia de saúde da Família da Unidade Básica de Saúde Milton Lopes, Imperatriz-MA pela contribuição para a realização do trabalho e a todos os pacientes que participaram da pesquisa.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

## REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020*, Clannad Editora Científica, São Paulo, 2021. URL: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/08/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-20201.pdf>, accessed in July 2022.
2. American Diabetes Association (ADA), Standards of medical care in diabetes abridged – 2015 for primary care providers, *Clinical Diabetes*, **33**, 97-111 (2015).
3. International Diabetes Federation (IDF), *IDF Diabetes Atlas: sixth edition – 2014*. URL: <https://diabetesatlas.org/atlas/sixth-edition>, accessed in August 2020.
4. M. Edmonds, C. Manu, P. Vas, The current burden of diabetic foot disease, *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, **17**, 88-93 (2021).
5. American Diabetes Association (ADA), Standards of medical care in diabetes — 2021 abridged for primary care providers, *Clinical Diabetes*, **39**, 14-43 (2021).
6. World Health Organization (WHO), *Adherence to long-term therapies: Evidence for action, Geneva-Switzerland*. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42682/9241545992.pdf>, accessed in July 2022.
7. N.U.L. Tavares, A.D. Bertoldi, S.S. Mengue, *et al.*, Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil, *Revista de Saúde Pública*, **50**, 10s (2016).
8. S.S.C. Fernandes, R.S. Damascena, F.S. Portela, Avaliação da adesão ao tratamento farmacológico de idosos portadores de Diabetes Mellitus Tipo II acompanhados em uma rede de farmácias de Vitória da Conquista–Bahia, *Revista de Psicologia*, **13**, 241-263 (2019).
9. D.E. Morisky, L.W. Green, D.M. Levine, Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence, *Medical Care*, **24**, 67-74 (1986).



10. S. Magri, N.W. Amaral, D.N. Martini, *et al.*, Programa de educação em saúde melhora indicadores de autocuidado em diabetes e hipertensão, *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde*, **14**, 386-400 (2020).
11. H.C. Torres, V.H. Hortale, V.T. Schall, Validação dos questionários de conhecimento (DKN-A) e atitude (ATT-19) de Diabetes Mellitus, *Revista de Saúde Pública*, **39**, 906-911 (2005).
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), *IBGE cidades – Imperatriz, 2010*. URL: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=2105302>, accessed in July 2022.
13. J.D. Gibbons, S. Chakraborti, *Nonparametric Statistical Inference, Fourth Edition: Revised and Expanded*, Technometrics, 2003, Vol. 15, p. 421.
14. Z. Jannoo, N.M. Khan, Medication adherence and diabetes self-care activities among patients with type 2 diabetes mellitus, *Value in Health Regional Issues*, **18**, 30-35 (2019).
15. A.M. Alqarni, T. Alrahbeni, A. Al Qarni, H.M. Al Qarni, Adherence to diabetes medication among diabetic patients in the Bisha governorate of Saudi Arabia—a cross-sectional survey, *Patient Preference and Adherence*, **13**, 63-71 (2019).
16. W.H. Silva, D.S. Dantas, B.S. Nóbrega, *et al.*, Evaluation of adherence to pharmacological treatment, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **55**, e18341 (2019).
17. H.K. Al-Qazaz, S.A. Sulaiman, M.A. Hassali MA, *et al.*, Diabetes knowledge, medication adherence and glycemic control among patients with type 2 diabetes, *International Journal of Clinical Pharmacy*, **33**, 1028-1035 (2011).
18. A.K.O.T. Borba, I.K.G. Arruda, A.P.O. Marques, *et al.*, Conhecimento sobre o diabetes e atitude para o autocuidado de idosos na atenção primária à saúde, *Ciência & Saúde Coletiva*, **24**, 125-136 (2019).
19. G.M. Taye, L. Bose, T.B. Beressa, *et al.*, COVID-19 knowledge, attitudes, and prevention practices among people with hypertension and diabetes mellitus attending public health facilities in Ambo, Ethiopia, *Infection and Drug Resistance*, **13**, 4203-4214 (2020).
20. F.F.L. Rodrigues, M.A. Santos, C.R.S. Teixeira, *et al.*, Relação entre conhecimento, atitude, escolaridade e tempo de doença em indivíduos com diabetes mellitus, *Acta Paulista de Enfermagem*, **25**, 284-290 (2012).

21. H. Mosnier-Pudar, G. Hochberg, E. Eschwege, *et al.*, How patients attitudes and opinions influence self-care behaviours in type 2 diabetes: Insights from the French DIABASIS Survey, *Diabetes & Metabolismo*, **36**, 476-483 (2010).
22. J.C.L. Reckziegel, D.M.G.V. Silva, M.M. Crestani, *et al.*, Influência de fatores de proteção e de risco na resiliência e na adesão ao tratamento do diabetes mellitus em mulheres, *Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde*, **7**, 25-39 (2018).
23. M.A. Salci, B.H.S. Meirelles, D.M.G.V. Silva, Health education to prevent chronic diabetes mellitus complications in primary care, *Escola Anna Nery*, **22**, e20170262 (2018).

### COMO CITAR ESTE ARTIGO

L.H. Assunção-Lima, D.P. Gigante de Sousa, E.V. Caval-canti de Lima, G. Carvalho de Souza, L. H. Assunção, G.M. Gomes-Fontoura, L. Hunaldo dos Santos, L.A. de Carvalho-Silva, A. Silva-Reis, Adesão à terapia farmacológica de pacientes diabéticos e o grau de conhecimento sobre a doença, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 681-698 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.103964>

## Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com fibromialgia antes do tratamento farmacológico

Karine Raquel Uhdich Kleibert<sup>1a</sup>, Paula Lorenzoni Nunes<sup>1b</sup>, Emelli Fin Hermann<sup>1c</sup>, Ana Paula Weber Fell<sup>1d</sup>, Lenara Schalanski Krause<sup>1e</sup>, Raida Ahmad Musa Mheisen Husein<sup>1f</sup>, Francine Lautenchleger<sup>2</sup>, Carmen Cristiane Schultz<sup>1g</sup>, Ivan Ricardo Carvalho<sup>1h</sup>, José Antonio Gonzalez da Silva<sup>1i</sup>, Christiane de Fátima Colet<sup>1j</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio grande do Sul, Ijuí, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá, Estado de Paraná, Brasil.

ORCID:

<sup>1a</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7511-1977>, <sup>1b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6158-1484>,  
<sup>1c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6144-077X>, <sup>1d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4999-7919>,  
<sup>1e</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6127-8899>, <sup>1f</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5200-4869>,  
<sup>1g</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9989-1277>, <sup>1h</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7947-4900>,  
<sup>1i</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9335-2421>, <sup>1j</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2023-5088>,  
<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0219-6062>.

Correios eletrônicos:

<sup>1a</sup>karine.u.k@hotmail.com, <sup>1b</sup>paula\_n\_lorenzoni@hotmail.com, <sup>1c</sup>emellihermann@hotmail.com,  
<sup>1d</sup>ana.fell@sou.unijui.edu.br, <sup>1e</sup>lenara.krause@sou.unijui.edu.br, <sup>1f</sup>raidareumatologista@gmail.com,  
<sup>1g</sup>carmen.schultz@sou.unijui.edu.br, <sup>1h</sup>ivan.carvalho@unijui.edu.br, <sup>1i</sup>jose.gonzales@unijui.edu.br,  
<sup>1j</sup>christiane.colet@unijui.edu.br, <sup>2</sup>francinelautenchleger@hotmail.com

Recebido: 16 de julho de 2022

Revisado: 9 de março de 2023

Aceto: 15 de março de 2023

### RESUMO

**Introdução:** a fibromialgia (FM) é uma síndrome clínica que se manifesta com dor generalizada no corpo, principalmente muscular. Além deste sintoma, a FM está associada com: fadiga, sono não reparador, distúrbios cognitivos, ansiedade, depressão e alterações intestinais. Há a hipótese que o estresse oxidativo (EO) crônico pode ser um fator de risco para danos neurais que levam à FM. Entretanto, os estudos já publicados avaliaram diferentes marcadores e apresentam resultados controversos acerca da FM o que suscita a necessidade de novas pesquisas. **Objetivos:** avaliar os biomarcadores de EO, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), tióis não-proteicos (NP-SH) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de pacientes com

FM antes do início do tratamento farmacológico. Descrever as características socio-demográficas, os sintomas mais prevalentes, e analisar a correlação entre análises bioquímicas e biomarcadores de EO. **Materiais e métodos:** trata-se de um estudo transversal, quantitativo, analítico e observacional. A amostra foi constituída por pacientes de uma clínica particular, sexo feminino, das quais, 9 pacientes com fibromialgia, 9 controles negativos, e 9 controles positivos. **Resultados:** o TBARS foi maior no grupo com FM, e houve correlação entre as variáveis SOD e NP-SH nessa população. Destaca-se também, que as enzimas CAT e SOD, e os níveis de NP-SH, foram normais nos pacientes com FM. O sintoma mais relatado foi dor generalizada e cansaço e os níveis de creatinina foram estatisticamente menores no grupo FM. **Conclusões:** apesar dos níveis de enzimas antioxidantes estarem normais, os pacientes com fibromialgia apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica.

**Palavras-chave:** Superóxido dismutase, catalase, glutathione, medicamentos, creatinina.

## SUMMARY

### Biomarkers of oxidative stress in patients with fibromyalgia before pharmacological treatment

**Introduction:** fibromyalgia (FM) is a clinical syndrome that manifests itself with generalized pain in the body, mainly in the muscles. In addition to this symptom, FM is associated with: fatigue, non-restorative sleep, cognitive disorders, anxiety, depression and intestinal disorders. It is hypothesized that chronic oxidative stress (OS) may be a risk factor for neural damage that leads to FM. However, studies that have already been published have evaluated different markers and present controversial results about FM, which raises the need for further research. **Aims:** To evaluate the biomarkers of EO, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), non-protein thiols (NP-SH) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in patients with FM before starting pharmacological treatment. To describe the sociodemographic characteristics, the most prevalent symptoms, and to analyze the correlation between biochemical analyzes and OS biomarkers. **Materials and methods:** This is a cross-sectional, quantitative, analytical and observational study. The sample consisted of female patients from a private clinic, including 9 patients with fibromyalgia, 9 negative controls, and 9 positive controls. Results: TBARS was higher in the FM group, and there was a correlation between SOD and NP-SH variables in this population. It is also noteworthy that CAT and SOD enzymes, and NP-SH levels, were normal in patients with FM. The most reported symptom was generalized pain and tired-

ness and creatinine levels were statistically lower in the FM group. **Conclusions:** Despite normal levels of antioxidant enzymes, fibromyalgia patients had high levels of lipid peroxidation.

**Keywords:** Superoxide dismutase, catalase, glutathione, drugs, creatinine.

## RESUMEN

### Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con fibromialgia antes del tratamiento farmacológico

**Introducción:** la fibromialgia (FM) es un síndrome clínico que se manifiesta con dolor generalizado en el cuerpo, principalmente en los músculos. Además de este síntoma, la FM se asocia con: fatiga, sueño no reparador, trastornos cognitivos, ansiedad, depresión y trastornos intestinales. Se plantea la hipótesis de que el estrés oxidativo (OS) crónico puede ser un factor de riesgo de daño neuronal que conduce a la FM. Sin embargo, estudios ya publicados han evaluado diferentes marcadores y presentan resultados controvertidos sobre la FM, lo que plantea la necesidad de seguir investigando. **Objetivos:** evaluar los biomarcadores de EO, catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), tioles no proteicos (NP-SH) y especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en pacientes con FM antes de iniciar tratamiento farmacológico. Describir las características sociodemográficas, los síntomas más prevalentes y analizar la correlación entre los análisis bioquímicos y los biomarcadores de SG. **Materiales y métodos:** se trata de un estudio transversal, cuantitativo, analítico y observacional. La muestra estuvo compuesta por pacientes mujeres de una clínica privada, incluidas 9 pacientes con fibromialgia, 9 controles negativos y 9 controles positivos. **Resultados:** TBARS fue mayor en el grupo FM y hubo correlación entre las variables SOD y NP-SH en esta población. También es de destacar que las enzimas CAT y SOD, y los niveles de NP-SH, fueron normales en pacientes con FM. El síntoma más informado fue dolor generalizado y cansancio y los niveles de creatinina fueron estadísticamente más bajos en el grupo FM. **Conclusiones:** a pesar de los niveles normales de enzimas antioxidantes, los pacientes con fibromialgia tenían altos niveles de peroxidación lipídica.

**Palabras clave:** Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, medicamentos, creatinina.

## INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM) é uma síndrome clínica que se manifesta com dor generalizada no corpo, principalmente muscular. Além deste sintoma, ela está associada com: fadiga, sono não reparador, distúrbios cognitivos, ansiedade, depressão e alterações intestinais [1]. De acordo com revisão no período de 2005 a 2014, verificou-se valores de prevalência da FM na população em geral entre 0,2 e 6,6%, em mulheres entre 2,4 e 6,8%, na população de áreas urbanas entre 0,7 e 11,4%, entre rurais de 0,1 e 5,2% [2].

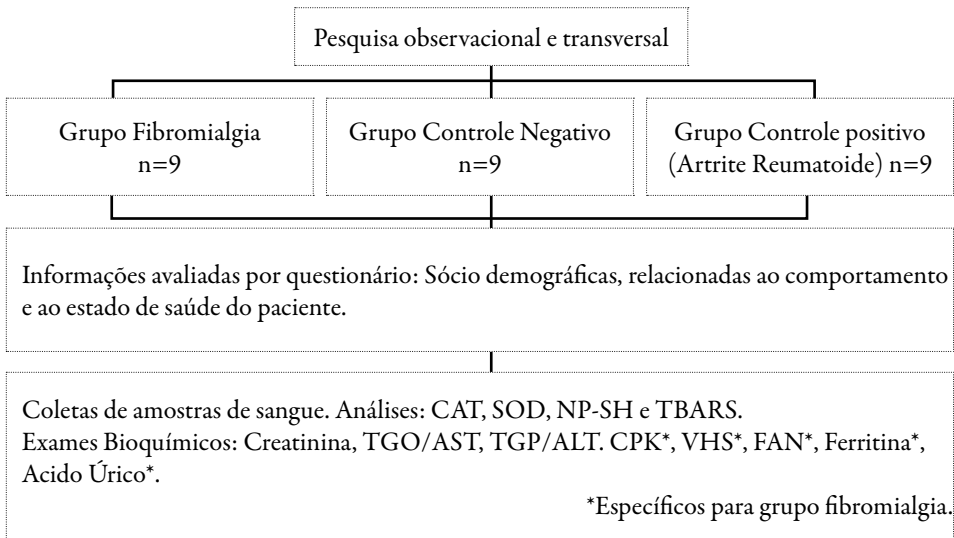
A FM tem uma fisiopatologia multifatorial, sendo que a sensibilização central é a principal explicação para a dor generalizada, uma das possíveis causas é a interrupção da neurotransmissão de monoaminas (serotonina e norepinefrina). Há também a hipótese que o estresse Oxidativo (EO) crônico pode ser um fator de risco para danos neurais que levam à FM [3]. Em estudo na Turquia, observou-se que a capacidade antioxidante total do plasma de pacientes com FM era significativamente menor do que em controles saudáveis, bem como o nível total de peróxido no plasma [4]. Outro trabalho que analisou biópsias de pele de pacientes com FM mostrou uma disfunção mitocondrial significativa, com atividades da cadeia mitocondrial e com níveis de bioenergética reduzidos, bem como valores aumentados de EO. Estes dados foram relacionados ao aumento dos níveis de inflamação e correlacionados à dor, principal sintoma da FM [5]. Alguns estudos mostram níveis reduzidos de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GSH-Rd) e glutatona peroxidase (GSH-Px) [6, 7]. Em contrapartida, Toker *et al.* encontrou atividade de SOD mais elevadas, mas não estatisticamente significativas [8], assim como Ozgocmen *et al.* que não encontrou diferenças de (SOD), xantina oxidase (XO) e adenosina desaminase (ADA) [9]. Tais resultados ainda demonstram a variabilidade de marcadores químicos que sinalizam processos de EO, como dosagem de enzimas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos, oxidação de componentes com proteínas e lipídeos, entre outros [10].

As espécies reativas, acima citadas, são capazes de produzir danos em diversos processos, com indução de proteínas e genes, alteração da estrutura do DNA, indução da peroxidação lipídica, entre outros [11]. Entre as pesquisas publicadas sobre a FM, foram avaliados diferentes marcadores, os quais apresentaram resultados controversos e demandam a necessidade de mais estudos.

A partir das considerações, o objetivo deste estudo é avaliar os biomarcadores de EO, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), tióis não-proteicos (NP-SH) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de pacientes com FM antes do início do tratamento farmacológico. Descrever as características sociodemográficas, os sintomas mais prevalentes, e analisar a correlação entre análises bioquímicas e biomarcadores de EO.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, quantitativo, analítico e observacional. A amostra desta pesquisa foi constituída por pacientes de uma clínica particular do município de Ijuí/RS. A escolha dos participantes ocorreu por amostragem intencional. Os critérios de inclusão foram: ter diagnóstico de médica reumatologista de FM a partir dos critérios de Diagnóstico da FM [3], ser maior de 18 anos, aceitar participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos pacientes com outras doenças autoimunes inflamatórias, que fizeram uso de corticóides e AINES nos últimos dez dias ou que não aceitaram participar da pesquisa. A coleta de dados foi realizada nos meses de outubro de 2020 a maio de 2021. O procedimento de pesquisa está exemplificado no Fluxograma 1.



**Fluxograma 1.** Coleta de dados de pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico e controles positivos e negativos. Legenda: (AR) Artrite Reumatoide; (CAT) Catalase; (SOD) Superóxido Dismutase; (NP-SH) Tióis Não- Proteicos; (TBARS) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; (TGO/AST) Transaminase glutâmico-oxalacética; (TGP/ALT) Transaminase Glutâmico Pirúvica; (CPK) Creatinofosfoquinase; (VHS) Velocidade de hemossedimentação; (FAN) Anticorpo antinuclear.

Os dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes foram coletados através de um questionário, no momento da consulta médica. O grupo controle positivo - Artrite Reumatoide (CP - AR), foi escolhido considerando que os pacientes com essa doença

apresentam aumento do EO [12], sendo esses pacientes atendidos na mesma clínica médica, seguindo os mesmos procedimentos. O grupo controle negativo (CN) foi determinado a partir do pareamento por sexo e idade, no qual pessoas sem doenças e sem uso de medicamentos que aceitaram fazer parte da pesquisa foram incluídas. O cálculo e a classificação do Índice de Massa Corporal (IMC), foi realizado de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde [13].

Para quantificar a presença dos biomarcadores do EO foram utilizadas as técnicas laboratoriais como: CAT, SOD, NP-SH e TBARS. Além disso, foram realizados exames bioquímicos, para determinar dano hepático e renal, com a finalidade de descartar outros danos celulares que possam levar alteração do perfil oxidativo.

Para as análises dos biomarcadores de EO foi coletado sangue um tubo de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) para obtenção dos eritrócitos (RBC), no qual as amostras de sangue total foram centrifugadas por 15 minutos a 2500rpm, lavado por duas vezes em Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9% e recuperados por centrifugação. Após, essas foram congeladas em freezer a zero graus celsius até a análise. As técnicas foram realizadas utilizando espectrofotômetro UV-VIS, modelo IL-592-LC-BI.

As técnicas foram realizadas seguindo os procedimentos descritos a seguir:

#### *Técnica da CAT*

A atividade da CAT nas hemácias foi medida por método Aebi, através da adição de RBC a uma cubeta com tampão fosfato 50mM (pH 7,0) e a reação inicia pela adição de  $H_2O_2$  0,5 mM (pH 7,0), recém preparado. A taxa de decomposição de  $H_2O_2$  foi medida por espectrofotômetro em 240nm. A atividade da CAT expressa em  $\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2/\text{min}/\text{mL}$  de RBC [14].

#### *Técnica da SOD*

A atividade da SOD foi analisada pelo método descrito por McCord e Fridovich, que se baseia na capacidade de SOD para inibir a auto oxidação de adrenalina para adrenocromo. O teste foi realizado com uma solução diluída de RBC, utilizando três volumes, sendo lido em espectrofotômetro em 480nm. A atividade de SOD expressa em U SOD/mL de hemoglobina [15].

#### *Técnica do SH-não proteico*

Os grupos tiol não proteicos de hemácias, os quais permitem verificar indiretamente os níveis de Glutathiona (GSH), foram determinados utilizando RBC hemolizados com Triton 10%. A essa mistura acrescentado ácido tricloroacético (TCA) 20 % e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi usado como amostra e a partir



de então realizado a curva padrão, utilizando diferentes concentrações de GSH 1mM. Adicionado o DTNB e lido imediatamente em espectrofotômetro em 412 nM [16].

#### *Técnica da TBARS*

O TBARS utiliza RBC e seu preparo foi realizado com butilhidroxitolueno (BHT) 10 mM e TCA 20 %, para a homogeneização foi feita em vórtex e centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm. A amostra foi o sobrenadante, a partir do qual foi realizada uma curva padrão usando diferentes concentrações e volume de água destilada, MDA 0,03 mM, ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 10% e TBA 0,6%. Os tubos foram colocados em banho-maria a 95 °C por 60 minutos e foi realizada a leitura imediatamente em espectrofotômetro em 532 nm [17].

#### *Análises bioquímicas*

As análises bioquímicas convencionais de Creatinina, Creatinoquinase (CPK), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/AST), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT), Velocidade de hemossedimentação (VHS), Anticorpo Antinuclear (FAN), Ferritina (FER), Ácido úrico (AU), foram realizadas em laboratório terceirizado, seguindo os protocolos desse local.

Para a análise dos dados foram utilizadas fórmulas científicas no programa Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 23.0. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro Wilk. Os dados contínuos descritos através de média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil), e os dados categóricos através de frequência absoluta e relativa. Para verificar a associação entre as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de comparação de médias para amostras pareadas por teste *t de student*. Para análise da intensidade da correlação, foi realizado o teste de *Spermann*, sendo considerado o nível de 5% de significância.

O estudo foi realizado conforme prevê na Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (2012), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), conforme o parecer nº 4.019.693/2020.

## RESULTADOS

Participaram do estudo nove pacientes com diagnóstico de FM, sendo a amostra caracterizada por 44,44% com ensino médio completo, e a mesma porcentagem de ensino fundamental completo, a maioria casada, e 55,6% com IMC com classificação de sobre-

peso. 100% das pacientes com FM, assim com os grupos controles, foi composta por mulheres. Os demais dados, e características dos grupos controles estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características da amostra de pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico, grupo controle negativo e grupo controle positivo (Artrite reumatoide). Ijuí, 2020, 2021.

		FB - n(%)	CN - n(%)	CP-AR - n(%)
Idade	Média ± DP	47,22±8,95	48,22±8,95	48,55±8,19
Cor	Branca	3 (33,33)	6 (66,7)	6 (66,7)
	Parda	4 (44,44)	3(33,33)	3(33,33)
	Não responderam	2 (22,22)	0(0)	0(0)
Escolaridade	Ensino fundamental completo	4 (44,44)	3 (33,33)	6 (66,7)
	Ensino médio completo	4 (44,44)	2 (22,22)	1 (11,11)
	Ensino superior completo	1 (11,11)	4 (44,44)	2 (22,22)
Estado civil	Com companheiro	5 (55,6)	5 (55,6)	6 (66,7)
	Sem companheiro	4 (44,44)	4 (44,44)	3 (33,33)
IMC	Normal	1 (11,11)	3 (33,33)	2 (22,22)
	Sobrepeso	5 (55,6)	5 (55,6)	3 (33,33)
	Obesidade	3 (33,33)	1 (11,11)	3 (33,33)

(n) Numero; (DP) Desvio Padrão; (FB) Fibromialgia; (CN) Controle negativo; (AR) Artrite reumatoide; (CP) Controle positivo.

Maior percentual das participantes (77,8%) declarou não possuir doenças associadas, entretanto, uma participante afirmou ter ansiedade e outra, epilepsia. Em relação aos sintomas da FM, 100% relataram ter dor generalizada e cansaço, 77,8% problemas de sono, 44,44 % formigamento, 33,33% ansiedade e cefaléia, e 22,22 % alodinia e depressão.

Em relação aos marcadores do perfil de EO, foram observados maiores níveis de TBARS nos pacientes com FM, em relação ao controle negativo ( $p=0,014$ ), demonstrando assim maior peroxidação lipídica nesses pacientes, e não houve diferença significativa quando comparado ao controle positivo ( $p=0,552$ ). Os níveis de SOD foram menores, ao comparar-se com o grupo controle positivo ( $p=0,010$ ). Demais dados estão detalhados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Perfil dos marcadores de estresse oxidativo de pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico, grupo controle negativo e grupo controle positivo (Artrite reumatoide). Ijuí, 2020, 2021.

	FB	CN	CP	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>
CAT	106,46±47,67	77,65±26,47	81,85±31,23	0,229	0,157	0,783
SOD	168,15±107,08	173,19±112,83	357,21±160,97	0,932	0,010*	0,118
NP – SH	1417,39±1144,53	1393,34±400,49	2629,16±788,82	0,961	0,084	0,002*
TBARS	6,01±3,4	2,25±1,13	5,35±1,60	0,014*	0,552	0,000*

(p<sup>1</sup>) Fibromialgia x Controle Negativo; (p<sup>2</sup>) Fibromialgia x Controle Positivo; (p<sup>3</sup>) Controle Negativo x Controle Positivo; (CAT) Catalase (mmol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mL eri); (SOD) Superóxido Dismutase (mSOD/mL Hb); (NP-SH) Tióis Não-Proteicos (nmol NP-SH/mL eri); (TBARS) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (nmol MDA/mL eri). (p) do teste de t de Student para amostras emparelhadas.; (\*) p < 0,05.

O grupo FM teve níveis de creatinina, TGO, e TGP, dentro dos valores de referência. Os pacientes com FM e AR apresentaram média de creatinina, menor que o grupo CN, com diferença estatística, como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Exames bioquímicos (creatinina, TGO, e TGP) de pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico, grupo controle negativo e grupo controle positivo (Artrite reumatoide). Ijuí, 2020, 2021.

	FB	CN	CP – AR	P	Valores de Referência**
Creatinina	0,83 ± 0,14	1,04 ± 0,21	0,84 ± 0,24	0,043*	0,60 a 1,30 mg/dL
TGO	21,43 ± 5,94	18,22 ± 6,97	17,78 ± 6,99	0,26	< 39 U/L
TGP	18,57 ± 5,65	16±6,94	33,22 ± 48,34	0,41	< 41 U/L

Teste (p) do teste de t de Student para amostras emparelhadas; (\*) p < 0,05.

(TGO/AST) Transaminase glutâmico-oxalacética; (TGP/ALT) Transaminase Glutâmico Pirúvica;

\*p < 0,05; \*\*Valores de referência [18].

Na análise de correlação de variáveis, observou-se, forte correlação linear positiva entre: SOD e NP-SH; SOD e IMC; ácido úrico e CPK; e VHS e FAN. Houve uma correlação negativa entre ferritina e CPK. Demais dados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Correlação de variáveis, entre pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico. Ijuí, 2020, 2021.

V	TBARS	SOD	NP-SH	CPK	VHS	FAN	FER	AU	IMC
CAT	-0,018	0,59	0,56	-0,09	-0,18	0,085	0,16	0,096	0,55
TBARS		-0,21	-0,22	0,079	0,34	0,2	0,28	0,26	-0,51
SOD			0,8**	-0,14	-0,024	0,076	0,2	0,1	0,82**
NP-SH				-0,02	-0,12	-0,13	0,036	0,008	0,61
CPK					0,74*	0,74*	-0,74*	0,89**	-0,12
VHS						0,81**	-0,17	0,74*	-0,09
FAN							-0,34	0,89*	0,16
FER								-0,6	0,19
AU									0,035

(V) Variável; (SOD) Superóxido Dismutase; (NP-SH) Tióis Não-Proteicos; (CAT) Catalase; (TBARS) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; (CPK) Creatinofosfoquinase; (VHS) Velocidade de hemossedimentação; (FAN) Anticorpo Antinuclear; (FER) Ferritina; (AU) Ácido úrico; (IMC) Índice de massa corporal – estratificado. \*intensidade da correlação pelo teste de Spearman

Os pacientes com FM apresentaram resultados de ácido úrico, ferritina VHS e CPK, dentro dos valores de referência, demonstrando ausência de inflamação. Esses dados estão apresentados da Tabela 5.

**Tabela 5.** Exames de pacientes com fibromialgia antes do início do tratamento farmacológico. Ijuí, 2020, 2021.

	Ácido Úrico	Ferritina	VHS	CPK
Média ± Desvio Padrão	3,91 ± 0,91	128,85 ± 92,93	15,75 ± 6,62	111,00 ± 44,53
Mínimo	2,20	22,00	4,00	52,00
Máximo	4,90	235,00	23,00	161,00
Valores de referência	2,6 a 6,0 mg/dL*	10 - 291 ng/mL*	<25 mm	≤170U/L*

(CPK) Creatinofosfoquinase; (VHS) Velocidade de hemossedimentação; \*Valores de referência para o sexo feminino [18] [18].

## DISCUSSÃO

Os resultados de maior relevância evidenciados foram a maior quantidade de TBARS nos pacientes com FM e a correlação entre esta variável com SOD e NP-SH nestes pacientes. Destaca-se também, que as enzimas CAT e SOD, e os níveis de NP-SH foram semelhantes aos do controle negativo do estudo.

Os níveis de TBARS encontrados foram maiores no grupo FM, dado também demonstrado em outros estudos [4, 7, 9]. O Malondialdeído (MDA) é um dos principais indicadores de dano oxidativo lipídico nas membranas dos pacientes. Ele é um componente de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o produto final da peroxidação lipídica [19]. A oxidação excessiva de lipídios altera as propriedades físicas das membranas celulares, e está relacionado com a morte celular e com várias doenças [20]. Na FM, essa está associada aos sintomas clínicos da doença [21].

A relação do TBARS com a fisiopatologia das doenças, ainda não é bem compreendida, mas há evidências que os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO) aos neurônios da lâmina dorsal levam à excitabilidade da membrana, e estão relacionados à dor crônica [22]. Em estudo da relação entre alterações de estresse oxidativo induzidas por exercício e atividade parassimpática na síndrome da fadiga crônica (SFC) em pacientes e indivíduos saudáveis não houve correlações entre TBARS e dor em indivíduos saudáveis. Ao contrário, em pacientes com SFC, os níveis de TBARS foram relacionados à dor corporal, tanto no início do estudo e após o exercício, demonstrando a relação do TBARS nessas doenças [23]. Em adição, a indução da inflamação da medula espinhal, aumenta o TBARS juntamente com a sensibilidade à dor, e o tratamento, reduz o TBARS juntamente com a sensibilidade à dor [24]. Além disso, ao induzir a dor neuropática em ratos, o nível de MDA na medula espinhal foi maior quando comparado com o grupo controle [25]. Tais estudos demonstram, que ao lesionar ou alterar a medula, ocorre o aumento do TBARS, e conseqüentemente a dor.

Na FM o mecanismo primário da dor é a sensibilização central, em que as vias ascendentes da dor são reguladas positivamente, enquanto as vias inibitórias descendentes da dor são reguladas para baixo. Há também mecanismos periféricos envolvidos, assim como outras áreas do cérebro [26]. Considerando que, há relação do TBARS com alterações e lesões no SNC e, que na FM a amplificação da dor no sistema nervoso central é característica primordial [27], pode-se inferir que, essas alterações na FM, estão relacionadas aos níveis de TBARS.

Os níveis de CAT e SOD foram semelhantes aos controles negativos e a SOD apresentou resultados inferiores ao controle positivo. Outras investigações apontam menores

níveis dessas enzimas [6, 7] em pacientes com FM, com diferença estatística. Especificamente sobre a SOD, os estudos mostram bastante variação nos resultados, com atividade sem estatística significativa em relação aos CN [8, 9] corroborando com os achados deste estudo. Os níveis de Tióis Não-Proteicos não tiveram diferenças no grupo FM, o que demonstra níveis normais da glutatona. De encontro, em estudo com 105 pacientes com FM, evidenciou menores níveis de GSH-Px e GSH-Rd, com significância estatística, ao comparar com CN [7]. Considerando os níveis normais dos antioxidantes nos pacientes com FM, pode-se traçar duas hipóteses: a) que as ERO não chegaram a provocar alterações nos níveis de enzimas, apesar da clara oxidação lipídica; b) para esses marcadores a amostra utilizada para o estudo foi insuficiente para as inferências estatísticas.

Apesar do mecanismo patológico primário da FM ser alterações de sensibilização do SNC, como apresentado, há estudos que apontam que alterações imunológicas e inflamatórias, colaboram com a doença. Destaca-se o hormônio liberador de corticotropina (CRH), substância P (SP) e hemocinina-1 estruturalmente relacionada a SP (HK-1) elevados em pacientes com FM. As concentrações séricas das citocinas inflamatórias interleucina (IL) - 6 e fator de necrose tumoral (TNF) também aparecem maiores [28]. Os mastócitos do tálamo são os responsáveis por secretar mediadores pró-inflamatórios e neuro-sensibilizantes (CRH, histamina, IL-6, HK-1, SP, TNF, Triptase). Esses mediadores podem então ativar a microglia nos núcleos talâmicos ou caminhos nociceptivos ascendentes, criando a sensação de dor [29].

Ao contrário da FM, a AR possui um caráter autoimune e inflamatório no qual os linfócitos CD4 reconhecem antígenos na articulação e estimulam células plasmáticas, mastócitos, macrófagos e fibroblastos, a síntese de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina 1 $\beta$  [30]. As EROs são capazes de ativar ou desativar diferentes tipos de receptores, proteínas e moléculas de sinalização. Portanto, o equilíbrio redox confere a disfunção celular e, posteriormente, resulta no desenvolvimento de condições patológicas, incluindo AR [12]. Ou seja, nesses pacientes, parece que a inflamação, estresse oxidativo e o comprometimento do sistema antioxidante estão relacionados [31]. E, há alterações nos parâmetros de EO, como declínio significativo na capacidade de redução férrica, MDA e nível de óxido nítrico significativamente aumentados, marcadores de oxidação de proteínas significativamente diferentes, diminuição significativa nos níveis de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GSH-Rd) e antioxidantes não enzimáticos (vitamina C e GSH) [32]. As diferenças dos mecanismos envolvidos no EO explicam os resultados do presente trabalho, no qual SOD foi menor nos pacientes com FM, do que nos com AR, além disso, TBARS e NP-SH foram maiores em pacientes com AR quando comparado ao CN.

A análise de correlação linear demonstrou forte associação dos níveis de SOD e NP-SH. Em investigações com fígado de camundongos, foi encontrada tal relação em camundongos velhos, entretanto, foi analisado a GSH-Px, além disso, no mesmo estudo foi observado uma correlação em todos os animais para CAT e SOD [33]. A relação dessas enzimas pode ser explicada já que elas agem nas mesmas vias bioquímicas, como a degradação do superóxido (subproduto do metabolismo aeróbio), na qual formas da enzima SOD, catalisam a reação transformando o superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Este torna-se inofensivo pela ação da GSH-Px. Já a GSH-Rd recicla a glutatona oxidada em sua forma reduzida, usando elétrons do Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Ainda a CAT também quebra o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  [34]. Quando concentrações elevadas de superóxido estão presentes no organismo, todas essas enzimas assim como a glutatona reduzida, se elevam em decorrência da maior quantidade de substrato.

Entre os pacientes com FM, a maior parte estava com sobrepeso, tais resultados semelhantes a outro estudo [35], já Torquato *et al.* encontrou prevalência menor de sobrepeso e obesidade nessa população [36]. Na análise de correlação, o IMC, mostrou-se relacionado positivamente com a SOD. Em ratos é possível observar, que ao induzir a obesidade por dieta, aumenta-se também os níveis de SOD [37]. Em relação as outras variáveis de EO, não se teve relação estatística significativa, entretanto, sabe-se que a obesidade ou dieta hiperlipídica podem resultar em alterações de outros parâmetros do EO, como demonstrado em estudo no tecido cardíaco de camundongos obesos [38].

Em resumo, a presença de dor generalizada é essencial para o diagnóstico de pacientes com suspeita de FM [39]. Entretanto, além das características da própria doença, outra forma de auxiliar no diagnóstico, é o diagnóstico diferencial. Esse é importante, já que algumas condições podem mimetizar a FM como doenças musculoesqueléticas, neurológicas, endócrinas ou metabólicas, psiquiátricas/psicológicas e relacionadas a medicamentos [40], dessa maneira é importante realizar exames para descartá-las. Por isso, o presente trabalho avaliou o VHS, ácido úrico, ferritina e CPK, marcadores que então alterados em outras doenças, ou na inflamação. Dessa maneira, observou-se que para os pacientes com FM, como esperado, esses parâmetros encontraram-se dentro dos valores de referência. Além disso, foi avaliado o perfil hepático e renal, para descartar alterações, como hepatites, ou insuficiência renal, em ambos os grupos.

A enzima CPK é de importância clínica e seus níveis são rotineiramente usados como um indicador de lesão do músculo esquelético [41]. Já o aumento do ácido úrico pode causar sintomas articulares inflamatórios acometendo principalmente as articulações do hálux, tornozelos e joelhos [42], podendo ser confundida com doenças reumáticas. Em pacientes com distúrbios de oxidação de ácidos graxos, o ácido úrico e a creatina

quinase fornecem um sinal de alerta útil para a presença de um distúrbio de oxidação de ácidos graxos. O mecanismo de elevação do ácido úrico e da creatina quinase parece ser a degradação do tecido [43]. Não foi encontrado na literatura, como acontece a relação do aumento dos dois marcadores, nem estudos em pessoas com FM.

Há controvérsias, em relação ao nível de ferro em pacientes com FM. Um estudo aponta que esses pacientes têm uma prevalência bastante alta de deficiência de ferro não anêmica [44]. Em contrapartida outra investigação explícita que não observou redução dos níveis séricos de ferro ou marcadores substitutos das reservas de ferro [45]. No presente estudo a ferritina foi correlacionada negativamente a CPK, entretanto, não há estudos sobre essa relação.

O exame FAN deve ser interpretado com cautela e relacionado ao quadro clínico, pois um resultado positivo auxilia como diagnóstico de doença autoimune, enquanto que, ao mesmo tempo um FAN positivo está presente em uma parcela significativa de pessoas saudáveis. A causa da ampla positividade é diversa, e pode representar uma predisposição à autoimunidade que é comum, especialmente em mulheres [46]. Não foi encontrada justificativa na literatura, para a associação do FAN com AU, VHS e CPK. O que demonstra a necessidade de mais estudos para comprovação da associação e entendimento do mecanismo.

As médias de TGO, TGP e creatinina estiveram dentro dos valores de referência em ambos os grupos. Para as enzimas hepáticas não houve diferença estatística entre os pacientes com FM, CN e CP. Já para creatinina, foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Resultados semelhantes foram observados em pesquisa, na qual o nível de creatinina foi menor em pacientes com FM em comparação com controles saudáveis, entretanto, essa associação ocorreu apenas na comparação de um subgrupo com hemoglobina baixa entre pacientes com FM [47]. Através da espectroscopia de ressonância magnética, estudo encontrou que os pacientes com FM tinham menores quantidades de fosfocreatina [48]. Em adição, um ensaio randomizado, demonstrou que a suplementação de creatina aumentou o teor intramuscular de fosfocreatina [49]. Como a creatina e a fosfocreatina se degradam espontaneamente em creatinina e [34] a creatinina, além de ser utilizada como estimativa da função renal, pode ser usada para estimar a massa muscular [50], pode se acreditar que há alteração da massa muscular dos pacientes com FM.

A população de estudo foi composta por mulheres, o que pode ser explicado pela maior prevalência desse grupo com diagnóstico de FM, conforme a literatura [2]. Em relação aos sintomas da FM, em comparação com estudo que avaliou 500 mulheres com FM,



observou-se resultados semelhantes aos problemas de sono, já a ansiedade e cefaleia, teve maior prevalência no estudo de Rezende e Heymann [51].

O presente estudo apresenta algumas limitações, como o tamanho da amostra, a qual restringe as análises estatísticas. O uso de alguns medicamentos pela amostra, os quais não foram considerados para análise. Além disso, no presente estudo foram analisados 4 marcadores do EO, o que divergiu de alguns estudos sobre o tema, sendo que pesquisas futuras poderiam avaliar outras enzimas e antioxidantes não enzimáticos.

## CONCLUSÕES

O TBARS foi maior no grupo com FM, e houve correlação entre as variáveis SOD e NP-SH nessa população. Destaca-se também, que as enzimas CAT e SOD, e os níveis de NP-SH, foram normais nos pacientes com FM. A maior parte da amostra tinha sobrepeso, o sintoma mais relatado foi dor generalizada e cansaço e os níveis de creatinina foram estatisticamente menores no grupo fibromialgia.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Regional do Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, a PIBIC/UNIJUÍ e PIBIC/CNPQ.

## DECLARAÇÕES

Declaramos que o trabalho foi aprovado no comitê de ética e que não há nenhum potencial conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Reumatologia, Fibromialgia - Definição, Sintomas e Porque Acontece, 2016. URL: <https://www.reumatologia.org.br/orientacoes-ao-paciente/fibromialgia-definicao-sintomas-e-porque-acontece/> (acessado outubro 6, 2020).
2. A.P. Marques, A.d.S.d.E. Santo, A.A. Berssaneti, L.A. Matsutani, S.L.K. Yuan, A.P. Marques, *et al.*, Prevalence of fibromyalgia: Literature review update, *Rev. Bras. Reumatol.*, **57**, 356–363 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.01.005>

3. E. Lawson, M.S. Wallace, *Fibromyalgia Clinical Guidelines and Treatments*, Springer, 2015.
4. O. Altindag, H. Celik, Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia, *Redox Rep.*, **11**, 131–135 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1179/135100006X116628>
5. B. Sánchez-Domínguez, P. Bullón, L. Román-Malo, F. Marín-Aguilar, E. Alcocer-Gómez, A.M. Carrión, *et al.*, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia, *Mitochondrion*, **21**, 69–75 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.01.010>
6. M. La Rubia, A. Rus, F. Molina, M.L. Del Moral, Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status? *Clin. Exp. Rheumatol.*, **31**(6 Suppl 79), S121-S127 (2013).
7. V. Shukla, D.S. Kumar, M.A. Ali, S. Agarwal, S. Khandpur, Nitric oxide, lipid peroxidation products, and antioxidants in primary fibromyalgia and correlation with disease severity, *J. Med. Biochem.*, **39**, 165–170 (2020). Doi: <https://doi.org/10.2478/jomb-2019-0033>
8. A. Toker, S. Kucuksen, A. Kucuk, H. Cicekler, Serum ischemia-modified albumin and malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in patients with fibromyalgia, *Clin. Lab.*, **60**, 1609–1615 (2014). Doi: <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2014.131017>
9. S. Ozgocmen, H. Ozyurt, S. Sogut, O. Akyol, O. Ardicoglu, H. Yildizhan, Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns, *Rheumatol. Int.*, **26**, 598–603 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00296-005-0079-y>
10. S.M.L. Vasconcelos, M.O.F. Goulart, J.B.d.F. Moura, V. Manfredini, M.D.S. Benfato, L.T. Kubota, Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação, *Quím. Nova*, **30**, 1323–1338 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
11. G.N. Sharma, G. Gupta, P. Sharma, A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **28**, 139–154 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258>

12. A.-R. Phull, B. Nasir, I.U. Haq, S.J. Kim, Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis, *Chem. Biol. Interact.*, **281**, 121–136 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.024>
13. Brasil. Ministério da Saúde. BVS - Ministério da Saúde - Dicas em Saúde 2009. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/215\\_obesidade.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/215_obesidade.html) (accessed June 2, 2021).
14. H. Aebi, [13] Catalase *in vitro*, in: *Methods in Enzymology*, vol. 105, Academic Press, 1984, p. 121–126. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
15. J.M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049–6055 (1969). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
16. A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal. Biochem.*, **46**, 639–653 (1972). Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90335-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90335-1)
17. R.B. Moore, M.L. Brummitt, V.N. Mankad, Hydroperoxides selectively inhibit human erythrocyte membrane enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 527–534 (1989). Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90512-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90512-2)
18. Belo Horizonte, Manual de Exames Laboratoriais da rede SUS-BH 2016. URL: [https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/2018/documentos/Laboratorios/manual\\_exames\\_laboratoriais\\_rede\\_SUS-BH.pdf](https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/2018/documentos/Laboratorios/manual_exames_laboratoriais_rede_SUS-BH.pdf) (acessado maio 27, 2021).
19. A. Ninić, M. Sopić, J. Munjas, V. Spasojević-Kalimanovska, J. Kotur-Stevuljević, N. Bogavac-Stanojević, *et al.*, Association between superoxide dismutase isoenzyme gene expression and total antioxidant status in end-stage renal disease patients on hemodialysis, *Balk. Med. J.*, **35**(6), 431–436 (2018). Doi: <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2018.0170>
20. M.M. Gaschler, B.R. Stockwell, Lipid peroxidation in cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 419–425 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

21. M.D. Cordero, F.J. Cano-García, E. Alcocer-Gómez, M. De Miguel, J.A. Sánchez-Alcázar, Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: coenzyme Q<sub>10</sub> effect on clinical improvement, *PLoS One*, **7**(4), e35677 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035677>
22. S.N. Hassler, K.M. Johnson, C.E. Hulsebosch, Reactive oxygen species and lipid peroxidation inhibitors reduce mechanical sensitivity in a chronic neuropathic pain model of spinal cord injury in rats, *J. Neurochem.*, **131**, 413–417 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.12830>
23. A. Polli, J. Van Oosterwijck, J. Nijs, U. Marusic, I. De Wandele, L. Paul, *et al.*, Relationship between exercise-induced oxidative stress changes and parasympathetic activity in chronic fatigue syndrome: An observational study in patients and healthy subjects, *Clin. Ther.*, **41**, 641–455 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.12.012>
24. C.-T. Hsieh, Y.-J. Lee, J.W. Lee, S. Lu, M.A. Tucci, X. Dai, *et al.*, Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates the pain hypersensitivity, spinal inflammation and oxidative stress induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats, *Neurochem. Int.*, **135**, 104686 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104686>
25. B. Zhao, Y. Pan, Z. Wang, Y. Tan, X. Song, Intrathecal administration of Tempol reduces chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats by increasing SOD activity and inhibiting NGF expression, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **36**, 893–906 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0274-7>
26. S. Chinn, W. Caldwell, K. Gritsenko, Fibromyalgia pathogenesis and treatment options update, *Curr. Pain Headache Rep.*, **20**, 25 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11916-016-0556-x>
27. D.J. Clauw, Fibromyalgia: A clinical review, *JAMA*, **311**, 1547–1555 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3266>
28. I. Tsilioni, I.J. Russell, J.M. Stewart, R.M. Gleason, T.C. Theoharides, Neuropeptides CRH, SP, HK-1, and inflammatory cytokines IL-6 and TNF are increased in serum of patients with fibromyalgia syndrome, implicating mast cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **356**, 664–672 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1124/jpet.115.230060>

29. T.C. Theoharides, I. Tsilioni, M. Bawazeer, Mast cells, neuroinflammation and pain in fibromyalgia syndrome, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 353 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00353>
30. W.F. Rodrigues, C.B. Miguel, N.S. Mendes, M.V. Bonifácio, R.B. Miguel, J.E.L. Chica, *et al.*, Artrite reumatoide: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento, *Revista Saúde Multidisciplinar*, **4**(1), 37–57 (2017). URL: <http://revistas.famp.edu.br/revistasaudemultidisciplinar/article/view/43/40>
31. A. Lo Gullo, G. Mandraffino, M.A. Sardo, A. D’Ascola, F. Mamone, S. Loddo, *et al.*, Circulating progenitor cells in rheumatoid arthritis: association with inflammation and oxidative stress, *Scand. J. Rheumatol.*, **43**, 184–193 (2014). Doi: <https://doi.org/10.3109/03009742.2013.836564>
32. S. Mateen, S. Moin, A.Q. Khan, A. Zafar, N. Fatima, Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis, *PLoS One*, **11**, e0152925 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925>
33. K.K. Muradian, N.A. Utiko, V. Fraifeld, T.G. Mozhukhina, I.N. Pishel, A.Y. Litoshenko, Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: linear regression and correlation, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **35**, 205–214 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(02\)00025-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(02)00025-0)
34. D.L. Nelson, M.M. Cox, *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6a ed., Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2014.
35. R.M. Fred-Jiménez, M. Arroyo-Ávila, Á.M. Mayor, G. Ríos, L.M. Vilá, Clinical manifestations associated with overweight/obesity in Puerto Ricans with fibromyalgia syndrome, *J. Obes.*, **2016**, 1379289 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1155/2016/1379289>
36. A.C. Torquato, F.A. Dias, L.B. Wachholz, A.d.J.P. Moraes, L.Â.N. Nesello, Comparação entre os resultados obtidos por diferentes métodos de avaliação da composição corporal em mulheres com síndrome de fibromialgia, *RBONE – Rev. Bras. Obesidade Nutr. Emagrecim.*, **13**, 103–110 (2019).
37. H.R. Sorato, *Efeitos da redução calórica associada ao treinamento resistido sobre resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação em camundongos com obesidade induzida por dieta*, Dissertação de Mestrado, PósGraduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, 2019.

38. M.S. Rodrigues, B.L.d.S. Pieri, G.d.B. Silveira, R.P. Zaccaron, L.M. Venturini, V.H. Comin, *et al.*, Redução do estresse oxidativo melhora a sinalização da insulina em tecido cardíaco de camundongos obesos, *Einstein* (São Paulo), **18**, 1–8 (2020). Doi: [https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2020AO5022](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO5022)
39. R.E. Heymann, E.S. Paiva, J.E. Martinez, M. Helfenstein, Jr., M.C. Rezende, J.R. Provenza, *et al.*, New guidelines for the diagnosis of fibromyalgia, *Rev. Bras. Reumatol.*, **57**, s467–s476 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.07.002>
40. W. Häuser, S. Perrot, C. Sommer, Y. Shir, M.-A. Fitzcharles, Diagnostic confounders of chronic widespread pain: Not always fibromyalgia, *Pain Rep.*, **2**(3), e598 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000598>
41. M.J. McLeish, G.L. Kenyon, Relating structure to mechanism in creatine kinase, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **40**(1), 1–20 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1080/10409230590918577>
42. Sociedade Brasileira de Reumatologia, *Gota*, 2017. URL: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/gota/> (acessado maio 27, 2021).
43. D. Marsden, W.L. Nyhan, B.A. Barshop, Creatine kinase and uric acid: Early warning for metabolic imbalance resulting from disorders of fatty acid oxidation, *Eur. J. Pediatr.*, **160**, 599–602 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1007/s004310100808>
44. S. Okan, A.C. Turk, H. Sivgin, F. Ozsoy, F. Okan, Association of ferritin levels with depression, anxiety, sleep quality, and physical functioning in patients with fibromyalgia syndrome: A cross-sectional study, *Croat. Med. J.*, **60**(6), 515–520 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.515>
45. R. Mader, Y. Koton, D. Buskila, P. Herer, M. Elias, Serum iron and iron stores in non-anemic patients with fibromyalgia, *Clin. Rheumatol.*, **31**, 595–599 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10067-011-1888-x>
46. D.S. Pisetsky, Antinuclear antibody testing - Misunderstood or misbegotten? *Nat. Rev. Rheumatol.*, **13**, 495–502 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.74>
47. Y.-H. Jung, W.J. Lee, D. Lee, J.Y. Lee, J.Y. Moon, Y.C. Kim, *et al.*, Commonalities and differences in abnormal peripheral metabolites between patients with fibromyalgia and complex regional pain syndrome, *Int. J. Neurosci.*, **130**, 653–661 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1080/00207454.2019.1702542>

48. J.H. Park, P. Phothimat, C.T. Oates, M. Hernanz-Schulman, N.J. Olsen, Use of P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect metabolic abnormalities in muscles of patients with fibromyalgia, *Arthritis Rheum.*, **41**, 406–413 (1998). Doi: [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199803\)41:3<406::AID-ART5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199803)41:3<406::AID-ART5>3.0.CO;2-L)
49. C.R.R. Alves, B.M. Santiago, F.R. Lima, M.C.G. Otaduy, A.L. Calich, A.C.C. Tritto, *et al.*, Creatine supplementation in fibromyalgia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Care Res.*, **65**, 1449–1459 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1002/acr.22020>
50. K. Kashani, M.H. Rosner, M. Ostermann, Creatinine: From physiology to clinical application, *Eur. J. Intern. Med.*, **72**, 9–14 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.025>
51. M.C. Rezende, E.S. Paiva, M. Helfenstein, Jr., A. Ranzolin, J.E. Martinez, J.R. Provenza, *et al.*, EpiFibro - um banco de dados nacional sobre a síndrome da fibromialgia: análise inicial de 500 mulheres, *Rev. Bras. Reumatol.*, **53**, 382–387 (2013).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

K.R. Uhdich-Kleibert, P. Lorenzoni-Nunes, E.F. Hermann, A.P. Weber-Fell, L. Schallanski-Krause, R.A.M. Mheisen-Husein, F. Lautenchleger, C.C. Schultz, I.R. Carvalho, J.A. Gonzalez da Silva, C. de Fátima-Colet, Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com fibromialgia antes do tratamento farmacológico, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 699-719 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.103781>

# Variantes alélicas de CYP2D6: \*3, \*4, \*5 y \*6 en pacientes con enfermedad de Huntington residentes en el municipio de Juan de Acosta, Atlántico (Colombia)

Aracely del Carmen García Cuan<sup>1a\*</sup>, Jennifer Andrea Flórez Cifuentes<sup>1b</sup>,  
María Fernanda Macías Puente<sup>1c</sup>, Jaime Antonio Navarro Navarro<sup>1d</sup>,  
Fernando Rondón González<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Seccional Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Microbiología y Genética, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

ORCID:

<sup>1a</sup><https://orcid.org/0000-0003-0047-4073>, <sup>1b</sup><https://orcid.org/0000-0001-6634-8737>,

<sup>1c</sup><https://orcid.org/0000-0001-7630-4228>, <sup>1d</sup><https://orcid.org/0000-0002-4293224X>,

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-1930-9118>

Correos electrónicos:

<sup>1a</sup>[aracely450@gmail.com](mailto:aracely450@gmail.com), <sup>1b</sup>[Bellotaflo@hotmail.com](mailto:Bellotaflo@hotmail.com), <sup>1c</sup>[Marief\\_0318@hotmail.com](mailto:Marief_0318@hotmail.com),

<sup>1d</sup>[jaimea.navarron@unilibre.edu.co](mailto:jaimea.navarron@unilibre.edu.co), <sup>2</sup>[ferongon@uis.edu.co](mailto:ferongon@uis.edu.co)

\*Autora de correspondencia

Recibido: 23 de agosto de 2022

Revisado: 15 de marzo de 2023

Aceptado: 22 de marzo de 2023

## RESUMEN

**Introducción:** las variaciones del metabolismo de fármacos se basan en factores constitucionales, genéticos y ambientales; por tanto, conocer el tipo y frecuencias alélicas del polimorfismo del gen CYP2D6 de pacientes con enfermedad de Huntington es relevante en la aplicación y eficacia de tratamientos farmacológicos beneficiosos y que mejoren su calidad de vida. **Objetivo:** establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del gen CYP2D6: \*3, \*4, \*5 y \*6 en una muestra poblacional de pacientes con enfermedad de Huntington en Juan de Acosta, Colombia. **Materiales y métodos:** estudio transversal, con muestreo de conveniencia no probabilístico constituido por 23 individuos: 10 pacientes con signos y síntomas de la condición, 5 familiares y 8 personas no relacionadas. Previa firma de consentimiento informado, en muestras de sangre periférica se aisló y cuantificó ADN en espectrofotómetro



UV-Vis. La identificación de polimorfismos: \*3, \*4 y \*6 se realizó por variante RFLP-PCR convencional y digestión con endonucleasas. El alelo \*5 y duplicación del gen CYP2D6 se genotiparon mediante PCR real múltiple. **Resultados:** en la muestra poblacional los alelos CYP2D6 \*4 y \*6 tienen frecuencias de 0,304 y 0,435, respectivamente; CYP2D6 \*3 es monomórfico; asumiendo equilibrio genético poblacional, la frecuencia del alelo mutado \*5 es 0,295 y de 0,511, la duplicación CYP2D6. **Conclusiones:** el genotipo más representado en la población fue el alelo silvestre \*1/\*1 de CYP2D6\*3, homocigótico, el genotipo \*4/\*4 con alelo mutado representa 30,4%; finalmente, una frecuencia de 26,1% con duplicación/multiplicación de alelos CYP2D6 activos, valor mayor a los reportados en poblaciones mestizas hispanoamericanas y colombiana.

**Palabras clave:** enfermedad de Huntington, genotipo, CYP2D6, clozapina, tetrabenazina, farmacogenética, frecuencia alélica.

## SUMMARY

### CYP2D6 allelic variants: \*3, \*4, \*5 and \*6 in patients with Huntington's disease residing in the municipality of Juan de Acosta, Atlántico (Colombia)

**Introduction:** Variations in drug metabolism are based on constitutional, genetic and environmental factors; therefore, knowing the type and allelic frequencies of the CYP2D6 gene polymorphism in patients with Huntington's disease is relevant in the application and efficacy of available pharmacological treatments that are beneficial and improve their quality of life. **Aim:** To establish the allelic and genotype frequencies of the CYP2D6 gene: \*3, \*4, \*5 and \*6 in a population sample of patients with Huntington's disease in Juan de Acosta, Colombia. **Material and methods:** Cross-sectional study, with non-probabilistic convenience sampling consisting of 23 individuals: 10 patients with signs and symptoms of the condition, 5 relatives and 8 unrelated people. After signing the informed consent, DNA was isolated and quantified in peripheral blood samples using a UV-Vis spectrophotometer. The identification of polymorphism: \*3, \*4 and \*6 was performed by Variant RFLP-conventional PCR and digestion with endonucleases. The \*5 allele and CYP2D6 gene duplication were genotyped by multiplex real PCR. **Results:** In the population sample, the CYP2D6 \*4 and \*6 alleles have frequencies 0.304 and 0.435, respectively; CYP2D6 \*3 is monomorphic; assuming population genetic equilibrium, the frequency of the mutated allele \*5 is 0.295 and 0.511, the CYP2D6 duplication.

**Conclusions:** The most represented genotype in the population was the wild type \*1/\*1 of CYP2D6\*3, homozygous, the genotype \*4/\*4 with mutated allele represents 30.4%; finally, a frequency of 26.1% with duplication/multiplication of active CYP2D6 alleles, a higher value than those reported in the Hispano-American and Colombian populations.

**Keywords:** Huntington's disease, CYP2D6 genotype, clozapine, tetrabenazine, pharmacogenetics, allelic frequency.

## RESUMO

### Variantes alélicas de CYP2D6: \*3, \*4, \*5 e \*6 em pacientes com doença de Huntington residentes no município de Juan de Acosta, Atlântico (Colômbia)

**Introdução:** variações no metabolismo de drogas são baseadas em fatores constitucionais, genéticos e ambientais; portanto, conhecer o tipo e as frequências alélicas do polimorfismo do gene CYP2D6 em pacientes com doença de Huntington é relevante na aplicação e eficácia de tratamentos farmacológicos benéficos que melhoram sua qualidade de vida. **Objetivo:** estabelecer as frequências alélicas e genotípicas do gene CYP2D6: \*3, \*4, \*5 e \*6 em uma amostra populacional de pacientes com doença de Huntington em Juan de Acosta, Colômbia. **Materiais e métodos:** estudo transversal, com amostragem não probabilística por conveniência composta por 23 indivíduos: 10 pacientes com sinais e sintomas da doença, 5 familiares e 8 pessoas não aparentadas. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, o DNA foi isolado e quantificado em amostras de sangue periférico em espectrofotômetro UV-Vis. A identificação dos polimorfismos: \*3, \*4 e \*6 foi realizada pela variante RFLP-PCR convencional e digestão com endonucleases. O alelo \*5 e a duplicação do gene CYP2D6 foram genotipados por PCR multiplex real. **Resultados:** na amostra populacional, os alelos CYP2D6 \*4 e \*6 apresentam frequências de 0,304 e 0,435, respectivamente; CYP2D6 \*3 é monomórfico; assumindo o equilíbrio genético da população, a frequência do alelo \*5 mutado é 0,295 e a duplicação CYP2D6 é 0,511. **Conclusões:** o genótipo mais representado na população foi o alelo selvagem \*1/\*1 de CYP2D6\*3, homozigoto, o genótipo \*4/\*4 com alelo mutado representa 30,4%; por fim, uma frequência de 26,1% com duplicação/multiplicação dos alelos CYP2D6 ativos, valor superior aos relatados em populações hispano-americanas e mestiças colombianas.

**Palavras-chave:** doença de Huntington, genótipo, CYP2D6, clozapina, tetrabenazina, farmacogenética, frequência alélica.

## INTRODUCCION

La enzima Citocromo P-450 CYP2D6 es una monooxigenasa partícipe del metabolismo de una gran variedad de fármacos neurolépticos y antipsicóticos de prescripción frecuente en la enfermedad de Huntington como la tetrabenazepina y clozapina, entre otros [1, 2]. El gen que codifica para CYP2D6 está situado en una región altamente polimórfica del cromosoma 22q13.1 [3]. Dentro de las principales causas de la variedad de respuestas interindividuales a fármacos que son metabolizados por el citocromo P450-CYP2D6 están las variantes alélicas, se han descrito alrededor de 70, las cuales, en su mayoría llevan a un cambio en la actividad enzimática ([www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)).

El aumento, disminución o pérdida completa de la actividad enzimática resultado de la expresión génica permite definir cuatro fenotipos posibles: **los metabolizadores rápidos (normales) (MR)** poseen dos alelos con función normal, los **metabolizadores intermedios (MI)** poseen una copia del gen activo y una copia de un alelo no funcional o dos alelos con actividad enzimática reducida, mientras que los **metabolizadores lentos (ML)** son aquellos individuos que poseen ambos alelos no funcionales. Los **metabolizadores ultrarrápidos (MU)** son aquellos que tienen múltiples copias de alelos funcionales [4]. Existe una gran variabilidad étnica en la diversidad de los alelos y la incidencia en los fenotipos [5]. Entre un 5 a 10% de la población caucásica son ML para los sustratos de CYP2D6 y la delección completa del gen CYP2D6 (alelo \*5) representa el 4-6% de la población [6-8].

En este trabajo se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos \*3, \*4, \*5 y \*6 del gen CYP2D6 de pacientes sintomáticos con enfermedad de Huntington residentes en el municipio de Juan de Acosta – Colombia. Para ello, se usó una combinación de métodos basados en RFLP-PCR y la técnica de qPCR múltiplex.

## METODOLOGÍA

Estudio descriptivo, transversal y de investigación aplicada a seres humanos con muestreo de conveniencia no probabilístico. La muestra estuvo constituida por 23 individuos voluntarios, oriundos y residentes de Juan de Acosta: 10 pacientes (4 mujeres y 6 hombres) con signos y síntomas de la condición, cinco familiares y ocho personas sin parentesco, quienes fueron convocados e informados sobre los objetivos y la importancia del estudio. Los participantes cumplieron con los criterios propuestos de inclusión: voluntarios, mayores de 18 años, firma del consentimiento y exclusión, no alcohólicos ni con enfermedad hepática actual. Los pacientes con enfermedad de Huntington

reportaron que los fármacos prescritos con más frecuencia son tetrabenazina o clozapina; algunos, están tomando unos, amantadina y otros, ácido valproico.

Todas las actividades de este proyecto fueron previamente aprobadas por el comité científico y comité de Bioética de la Universidad Libre Seccional Barranquilla, las Secretarías de Salud Departamental y Municipal, y la Fundación de Enfermos de Huntington de Juan de Acosta.

#### **Extracción de ADN:**

Se extrajeron y procesaron 23 muestras de sangre periférica obtenidas de cada uno de los participantes. Se utilizó el método de columna para la extracción de células blancas según protocolo del kit GenElute Blood Genomic DNA (NA2020). El ADN se cuantificó con espectrofotómetro de microvolumen UV-Vis (Thermo Scientific™). La pureza del ADN fue verificada por electroforesis en agarosa al 0,8%, con el uso de coloración fluorescente intercalante de ADN de doble cadena NANCY 525 (Sigma). La concentración final del ADN se ajustó a 20 ng/μL. Luego, se reservó alicuotado a -60 °C para diferentes procedimientos moleculares.

#### **Selección de Primers:**

Se seleccionaron según las referencias a continuación mostradas y se confirmaron con el programa BLAST del NCBI (Tabla 1).

Para identificar los alelos CYP2D6 \*3, \*4 y \*6, utilizando el método RFLP-PCR convencional con un juego de pares de primers confrontados, se procedió a la amplificación del segmento según protocolos publicados en la literatura científica consultada [8-11] (Tabla 2):

La reacción se llevó a cabo en 35 ciclos. Pre calentamiento a 95 °C por 5 min. Desnaturalización a 95 °C por 30 segundos. Anillamiento a 58,8 °C por 30 segundos. Extensión a 72 °C por 30 segundos, 72 °C por 5 min., 4 °C ∞. El Protocolo de electroforesis horizontal utilizado fue: Gel de agarosa 2%, buffer TBE 0,5X NANCY 520; los productos de PCR se separaron a 65 voltios por 1 hora y 20 minutos. Los amplificados se observaron en transiluminador de luz UV y luego, fotografiados. Se confirmó el segmento amplificado (Figura 1) por secuenciación realizada en Macro Gen.

**Tabla 1.** Primers usados en las pruebas de RFLP-PCR convencional y PCR-tiempo real.

GENOTIPO (ALELO)	PRIMERS 5'----3' FORWARD	PRIMERS 5'----3' REVERSE
CYP2D6*3 _A-2549-del.	D6*3F: GATGAGCTGCTAACTGAGCCC	D6*3R: CCGAGAGCATACTCGGGAC (10)
CYP2D6*4 G-1846-A	D6*4F: GCCTTCGCCAACCACTCCG	D6*4R: AAATCCTGCTCTTCCGAGGC (9)
CYP2D6*5 Delección total	D6*5F: CACCAGGCACCTGTACTCCTC	D6*5R: CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC (11)
CYP2D6*6 T-1707-del	D6*6F: CCTGGGCAAGAA GTCGCTGGACCAG	D6*6R: GAGACTCCTCGGTCTCTCG (9)
DPKup (5.100 pb)	D6LE-F: GTTATCCAGAA GGCTTTGCAGGCTTCA (11)	DPKlow: GCCGACTGAGCCCT GGGAGGTAGGTA
2D6dupl-F	CCTGGGAAGGCCCCATGGAAG (11)	2D6dupl-R: CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT

Fuente: tomado de Flores *et al.* (2015) [9], Saghafi *et al.* (2018) [10] y Dorado *et al.* (2018) [11]

**Tabla 2.** Amplificación del segmento por PCR convencional para determinar los polimorfismos.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen a tomar (µL)	Concentración final
GoTaq Master Mix	2X	10	1X
Primer (Forward)	10 µM	1	0,5 µM
Primer (Reverse)	10 µM	1	0,5 µM
DNA	20 ng/µL	1,6 µL	< 250 ng
H <sub>2</sub> O TI	--	6,4 µL	--
	<b>Volumen Total</b>	<b>20 µL</b>	--

Fuente: elaborado por los investigadores (Tomado y modificado de [8-11]). µM: Micromoles; µL: microlitros; ng: nanogramos; H<sub>2</sub>O TI: agua ultrapura tipo I.

La Tabla 3 muestra los segmentos generados de la digestión con enzimas de restricción correspondientes a los alelos de CYP2D6 \*3, \*4 y \*6 (Figura 1).

**Tabla 3.** Productos de la digestión obtenidos con enzimas de restricción.

Polimorfismo	Longitud del producto (pb)	Enzima	Productos de la digestion
CYP2D6*3	276	<i>MspI</i>	Wild -type (AA): 188/88 Heterocigoto (A/-): 276/188/88 Mutante (-/-): 168/20
CYP2D6*4	309	<i>BstNI</i>	Wild-type (GG): 201/108 Heterocigoto (GA): 309/201/108 Mutante (AA): 309
CYP2D6*6	350	<i>BstNI</i>	Wild-type (GG): 190/160 Heterocigoto (GA): 350/190/160 Mutante (GC) (w: A o T): 350

Fuente: tomado de Saghafi *et al.* (2018) [10].

### Aplicación del método qPCR – múltiplex para determinar la Delección\*5 y Duplicación del CYP2D6.

Se utilizó el termociclador en tiempo real CFX96 (BIO-RAD), junto con el programa CFX manager para la realización del experimento y la visualización de los resultados y la supermix EvaGreen SSOFAST (BIORAD). Como control positivo se utilizó una muestra de ADN extra pura con número de referencia: NA1727 Coriell Institute for medical research [12]. Las concentraciones de las muestras se ajustaron a 15 µg/µL y el volumen a 20 µL [13], (Tabla 4).

**Delección \*5:** La desnaturalización se realizó a 95 °C por 2 min durante un ciclo y 94 °C, 1 minuto por 35 ciclos; la hibridación a 65 °C por 1 min.; la extensión a 68 °C por 5 minutos y la extensión final a 68 °C por 7 min.

**Duplicación de CYP2D6:** La desnaturalización se realizó a 95 °C por 2 min durante un ciclo y 94 °C, 2 minuto por 35 ciclos; la hibridación a 52 °C por 1 min.; la extensión a 68 °C por 3 minutos y la extensión final a 68 °C por 8 min.

Los resultados consisten en la interpretación de las curvas generadas por el equipo.

**Tabla 4.** Mezclas de reacción para: qPCR del alelo \*5 + DPK y detectar Duplicación del CYP2D6.

REACTIVOS	DELECIÓN ALELO *5 + DPK		DUPLICACIÓN DEL CYP2D6	
	Concentración	Volumen	Concentración	Volumen
EVAGREEN SSOFAST Super Mix	10x	10 µL	20x	10 µL
Primer F (DPKup)	100 µM	0,32 µL	100 µM	0,32 µL
Primer R (DPK low)	100 µM	0,32 µL	100 µM	0,32 µL
Primer F (5*)	100 µM	0,16 µL	--	--
Primer R (5*)	100 µM	0,16 µL	--	--
Primer 2D6dupl-Foward	--	--	100 µM	0,16 µL
Primer 2D6dupl-Reverse	--	--	100 µM	0,16 µL
Agua libre de RNasas	--	7,44 µL	--	7,44 µL
DNA	15 ng/mL	1,6 µL	15 ng/mL	1,6 µL

Fuente: elaboración por los investigadores. µM: micromoles; µL: microlitros; ng: nanogramos.

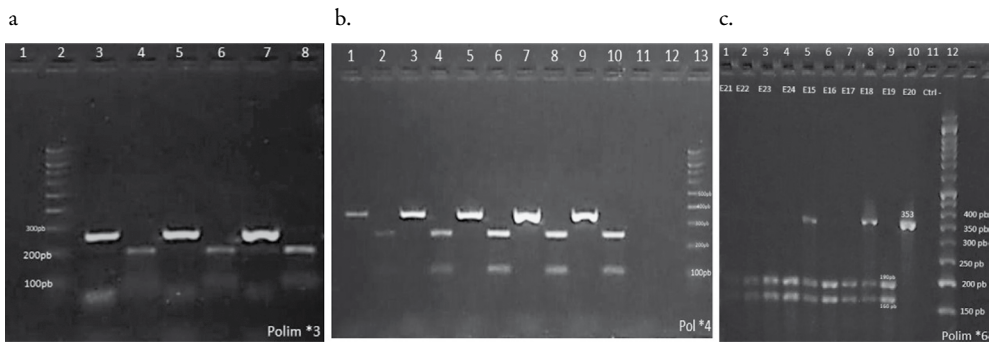
**Análisis estadístico de los resultados:** Para el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se realizó prueba que incluyó 10'001.406 permutaciones en Arlequín v3.5.2 ( $p < 0,05$ ) [14]. Los genotipos fueron construidos a partir de los alelos observados en cada persona para predecir el fenotipo, a partir del genotipo molecular.

## RESULTADOS

Las edades de los individuos vinculados al estudio estaban comprendidas entre 35 y 65 años (promedio: 45,5 años); el 65,21% (n=15) mujeres y 34,79% (n=8) hombres. El vínculo de parentesco entre los pacientes con enfermedad de Huntington y los familiares se encontraba desde, el primer grado hasta el cuarto grado de consanguinidad. El 37,5% toma medicamentos que no están asociados con la prescripción médica específica para su enfermedad, pero, les ayuda con los diferentes síntomas que se les presente como dolor de cabeza, oído y de las articulaciones. En contraste, los pacientes reportaron que los fármacos de prescripción para los síntomas de la patología, no los toma-

ban con la regularidad recomendada por los efectos secundarios como somnolencia, mareos y dificultad para realizar las labores cotidianas.

En la Figura 1 se observan los segmentos generados durante la digestión con enzimas de restricción correspondientes a los alelos de CYP2D6 \*3, \*4 y \*6 de esta muestra poblacional.



**Figura 1.** Patrones de corte con enzimas de restricción, electroforesis en agarosa al 3%.

a. Control negativo (línea 1), MP (línea 2), segmento sin tratamiento enzimático (línea 3, 5 y 7), segmentos digeridos (línea 4, 6, 8). b. Segmentos sin tratamiento enzimático (línea 1, 3, 5, 7, 9), Control negativo (línea 11), MP (línea 13). En a. y b en todas las líneas se observan muestras homocigotas para tipo salvaje (wt). c. segmentos digeridos del CYP2D6. En líneas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 se observan muestras homocigotas para tipo salvaje (wt); líneas 5, 8, muestras heterocigotas, línea 10 homocigoto mutante, línea 11 control negativo y MP (marcador de peso molecular). Fuente: Elaboración por los investigadores.

### Frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra poblacional.

En la tabla 5 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos \*3, \*4 y \*6 del CYP2D6 de la muestra poblacional.

**Tabla 5.** Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos CYP2D6\*.

Polimorfismo	Genotipo	Proporción genotípica (%)	Alelo	fa*	Valor p (EHW)
Cyp2D6*3	*1/*1	100,0	*1	1,0	
	*1/*3	0	*3	0,0	
	*3/*3	0			
Cyp2D6*4	*1/*1	48,4	*1	0,696	0,36506
	*1/*4	42,3	*4	0,304	
	*4/*4	9,3			
Cyp2D6*6	*1/*1	31,9	*1	0,565	1,00000
	*1/*6	49,2	*6	0,435	
	*6/*6	18,9			

Fuente: elaboración por los investigadores. \*fa: frecuencias alélicas.



**Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW):** se encontró que en la muestra poblacional el polimorfismo Cyp2D6\*3 es Monomórfico para el alelo silvestre. Los marcadores CYP2D6\*4 y CYP2D6\*6 no exhiben desviaciones de los preceptos de Hardy-Weinberg (EHW), dado los valores de  $p > 0,05$ , siendo este último marcador el que más aporta a la diversidad genética en términos de heterocigosidad esperada en la muestra poblacional (tabla 5). Todas las frecuencias esperadas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

*\*5 Delección*

La proporción genotípica de individuos \*5 corresponde a 8,7% mientras que la misma en los individuos con el fenotipo silvestre es 0,913. Asumiendo EHW, la frecuencia del alelo mutado es  $f = 0,295$  y la del alelo silvestre es  $f = 0,705$ .

*Duplicación*

La proporción genotípica de individuos con la duplicación del gen CYP2D6 corresponde a 26,1% mientras que la misma en los individuos con el fenotipo silvestre es 73,9%. Asumiendo EHW, la frecuencia del alelo mutado es  $f = 0,511$  y la del alelo silvestre es  $f = 0,489$ .

*Haplotipos CYP2D6\**

En total se detectaron cuatro haplotipos en la muestra poblacional, siendo el más frecuente aquel que incluye los tres alelos silvestres y el menos frecuente, el que incluye el alelo silvestre de los polimorfismos CYP2D6\*3 y CYP2D6\*6 y el alelo mutado del polimorfismo CYP2D6\*4 (Tabla 6).

**Tabla 6.** Tipo y frecuencia de haplotipos CYP2D6\*.

Haplotipo	Proporción (%)	de*
*1*1*1	54,02	0,000
*1*1*6	15,55	0,000
*1*4*1	2,50	0,000
*1*4*6	27,93	0,000

**Fuente:** elaboración por los investigadores. \*de: desviación estándar.

Se estableció que los pacientes y sus familiares comparten los haplotipos \*1\*1\*1, \*1\*1\*6 y \*1\*4\*6. Adicionalmente, los individuos que no son pacientes tienen en común con el grupo de pacientes y sus familiares los haplotipos \*1\*1\*1 y \*1\*1\*6, y presentan exclusivamente el haplotipo \*1\*4\*1.

## DISCUSION

Es reconocido que determinar la prevalencia de los polimorfismos de CYP2D6 en pacientes que reciben tratamiento con fármacos neurolépticos y antipsicóticos es de gran importancia en la farmacogenética. La enzima CYP2D6 participa en la fase I del metabolismo de casi el 25% de los fármacos clínicos y sus polimorfismos pueden afectar el proceso metabólico de aproximadamente el 50% de estos. Las variantes alélicas CYP2D6 pueden clasificarse en categorías, las cuales, generan una proteína con actividad catalítica nula, disminuida, normal, aumentada o cualitativamente alterada [15, 16]. Entre las variantes más importantes se encuentran CYP2D6 \* 2, CYP2D6 \* 4, CYP2D6 \* 5, CYP2D6 \* 10, CYP2D6 \* 17 y CYP2D6 \* 41 [2]. Las frecuencias de los alelos más frecuentes en una población son diferentes en cada grupo étnico [17]. De acuerdo con los antecedentes históricos, en Colombia y otros países latinoamericanos relacionados con el descubrimiento de América, se pueden diferenciar tres grupos étnicos importantes: los pueblos indígenas, los afrodescendientes y los mestizos; así, la población mayoritaria mestiza del caribe colombiano, es el producto del cruce entre el blanco español, el indígena nativo y el negro africano [18, 19].

En el presente estudio se analizó una muestra poblacional de Juan de Acosta, que incluyó pacientes sintomáticos de enfermedad de Huntington, algunos familiares y un grupo de individuos sin parentesco. Se utilizó la técnica molecular RFLP-PCR convencional, la cual, fue seleccionada porque a través del tamaño de los fragmentos de restricción, es posible determinar la presencia o no de la mutación, por tanto, el genotipo del paciente de forma rápida, reproducible y confiable. Sin embargo, estas pruebas dirigidas por sí solas no detectan variantes del número de copias, lo que puede cambiar el fenotipo asignado [16]. Por otro lado, se aplicó también, qPCR- Múltiple para identificar la Delección\*5 y la Multiplicación por su alta sensibilidad, especificidad, y se obtuvo una eficiencia de amplificación del 100% en todas las muestras, además de, permitir la cuantificación del número de copias del gen CYP2D6, con resultados reproducibles.

Asumiendo que, las distribuciones de las frecuencias genotípicas observadas se corresponden con las esperadas para los alelos \*3, \*4 y \*6 identificados mediante ensayo de RFLP-PCR convencional, según la Ley de Hardy Weinberg, en la tabla 5, se encontró que:

En la muestra poblacional “costera” el genotipo más representado fue el homocigótico para el alelo silvestre \*1/\*1 de CYP2D6\*3, igual resultado se obtuvo en la población de la región centroccidental de Venezuela [20]; la frecuencia esperada del alelo inactivo \*3 fue de (0,0) en la muestra de la población “costera” presentándose monomórfico. El CYP2D6\*3 presenta una delección de la adenina en la posición 2549 expresándose en

una proteína no funcional, sin actividad catalítica [21]. En el 2020, un estudio publicado por Sarmiento et al., realizado en Bogotá, con 212 sujetos voluntarios sanos no emparentados, de 18 a 58 años; 75% de ellos, hombres, reporta una frecuencia de 0,47% para este alelo CYP2D6\*3 en población mestiza (una mezcla de poblaciones: españolas, amerindias y africanas) de Bogotá, haciendo la observación para el análisis de los resultados, que a esta ciudad han llegado personas de diferentes regiones del país que contribuyen con el incremento en los porcentajes de mezcla [22]. Isaza *et al.*, también, en población mestiza colombiana, reportó el CYP2D6\*3 como alelo no funcional con una frecuencia de 1,2% [23].

En cuanto al genotipo \*4/\*4 en la muestra poblacional “costera”, la frecuencia esperada es de 9,3% y representa el 30,4% con el alelo mutado, en contraste con otros estudios realizados con mestizos en Colombia: el primero, realizado en Bogotá informa 4,25% para el genotipo y una frecuencia de 14,15% para el alelo mutado \*4 [22] y la otra investigación, reportada en población colombiana, 19,4% para CYP2D6\*4 [23]. Los amerindios, mestizos y eurodescendiente en América Latina presentan una prevalencia de este alelo de 0 a 21 [24]. En población venezolana de la región centroccidental la proporción del genotipo fue 2% y la respectiva variante \*4, fue la que estuvo representada con mayor frecuencia (16,5%); en mestizos cubanos, la frecuencia para esta variante \*4 fue 14,6% [10,17]; en poblaciones nativas de Argentina y Paraguay, identificadas como amerindios 51,2% [25] y en México 11,2% [26]. Todos los anteriores estudios informan frecuencias semejantes a aquellas reportadas para diferentes poblaciones europeas [6, 27-31], excepto, en Chile donde la frecuencia para el alelo \*4 fue menor 3.6% [32]. La variante CYP2D6\*4 presenta un cambio de guanina por adenina en la posición 1846, generando un codón de terminación que produce la síntesis de una proteína inactiva que contiene 181 aminoácidos en lugar de los 457 que codifica el alelo salvaje. Todas las variantes CYP2D6\*4 presentan el mismo defecto del acortamiento de la proteína, pero, cada subtipo tendrá sus características propias [21, 33].

Con relación al genotipo \*6/\*6 se estimó la proporción genotípica esperada en la muestra poblacional de 18,9% y la alélica de 43,5%, evidenciando mayor presencia del alelo, comparado con las frecuencias reportadas para otras poblaciones mestizas en Colombia: 0,47% para un genotipo heterocigoto (\*1/\*6) y la respectiva del alelo mutado \*6, de 0,47%, en Bogotá [22]; en población colombiana [23], se reportó 0.0 para el mutante \*6, lo que indica 100% silvestre (wt), y en otras poblaciones mestizas americanas [4-6, 20, 25, 32, 34-36]. Este alelo se encuentra principalmente en poblaciones Caucásicas, sus descendientes americanos presentan una frecuencia menor de 1% [9, 37]. El CYP2D6\*6 presenta una delección en el exón 3, de la timina en la posición 1707, expresando una proteína truncada, no funcional sin actividad catalítica ([www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)).

Las altas frecuencias de las variantes CYP2D6\*4 y CYP2D6\*6 obtenidas en el presente trabajo no son comparables con otros estudios de poblaciones étnicas semejantes, debido a las limitaciones para su realización como son: a) la muestra es pequeña; b) el muestreo es no convencional, pues, se trata de un grupo familiar de 10 pacientes sintomáticos con enfermedad de Huntington, otros 5 con relaciones de consanguinidad, pero, sin diagnóstico de la patología y 8 individuos sin parentesco; c) la falta de estudios previos de investigación sobre el CYP2D6 en la Región Caribe colombiana.

En la muestra poblacional en estudio, el 8,7% de los individuos portan la delección CYP2D6 \*5, el método utilizado PCR – tiempo real múltiple permitió la identificación (ausencia y/o presencia) sin discriminar si son homocigotos o heterocigotos. Se encontró una alta frecuencia (26,1%) de individuos con la duplicación/multiplicación de alelos CYP2D6 activos, valor mayor a los reportados en poblaciones mestizas hispanoamericanas, y bastante superior a la obtenida dentro de la población colombiana (1,2%) [22, 23].

Atendiendo a la revisión de la literatura científica sobre el tema, según la actividad metabólica, los genotipos pueden categorizarse [38], en:

- Funcionales, los Metabolizadores Rápidos (MR) e Intermedios (MI): los genotipos \*1/\*1; \*1/\*3; \*1/\*4; \*1/\*6.
- No Funcionales, Metabolizadores Pobres (MP): los genotipos \*3/\*3; \*4/\*4; \*6/\*6; delección \*5.
- Ultra Metabolizadores: los genotipos con Duplicaciones/Multiplicaciones.

De acuerdo con las anteriores categorías, en la muestra poblacional estudiada, en los 23 individuos, se encontraron algunos hallazgos significativos: mutación del alelo 4\* (3 metabolizadores lentos, 8 metabolizadores intermedios); mutación del alelo 6\* (4 metabolizadores lentos, 12 metabolizadores intermedios); delección del alelo 5\* (2 metabolizadores lentos y/o pérdida de la función de la enzima) y duplicación del gen CYP2D6 (6 metabolizadores ultrarrápidos), lo cual, genera una variabilidad interindividual en la biotransformación (Reacciones de Fase I) y como consecuencia, concentraciones plasmáticas diferentes durante el tratamiento a dosis terapéuticas, lo cual afecta de manera significativa la terapia farmacológica recibida por los pacientes, entre las que se destacan incrementos de las reacciones adversas, toxicidad medicamentosa y disminución de la efectividad [39].

Dentro del grupo de fármacos recibidos por los pacientes del estudio encontramos: Tetrabenazina (Inhibidor de la recaptación de monoaminas), el cual, es un inhibidor potente de la Isoforma CYP2D6, cuya consecuencia son las interacciones medicamen-

tosas fármaco-fármaco, en el metabolismo con los otros fármacos suministrados (Clonazepam, Ácido Valproico y Amantadina) produciendo en algunas ocasiones aumento de su concentración, reacciones adversas y posible toxicidad; el Ácido Valproico (Neuromoduladores) es también, un potente inhibidor del sistema microsomal P-450, especialmente, de las Isoformas CYP3A4 y CYP2D6 ocasionando iguales consecuencias a las descritas con Tetrabenazina, además, es un medicamento de margen terapéutico estrecho, y con el Clonazepam (Benzodiacepinas), son medicamentos catalogados según la legislación colombiana como de control especial, con alto potencial de generar adicción y dependencia, la interacción medicamentosa Ácido Valproico-Clonazepam se asocia a potencialización de los efectos del Clonazepam, relacionándose además con status convulsivo [40].

Es de anotar que los 3 medicamentos utilizados por los pacientes del estudio, en sus respectivas fichas técnicas publicadas por los laboratorios fabricantes, se reportan como reacciones adversas frecuentes clasificadas como Tipo A -Efecto Colateral según Rawlins y Thompson- las reportadas por los pacientes y/o cuidadores en la encuesta: somnolencia, astenia y sensación de mareo [41].

Es fundamental realizar un seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes estudiados, teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos en el estudio genético, para realizar una terapia farmacológica individualizada basada en el ajuste de la dosificación, y lograr de esta manera, aumentar la efectividad de la terapia farmacológica e incrementar la seguridad de la misma disminuyendo los potenciales efectos tóxicos y/o reacciones adversas [42].

En los pacientes metabolizadores intermedios y lentos, es necesario realizar una disminución en la dosis para reducir la incidencia de las reacciones adversas sobre todo los efectos colaterales que son dependientes de la dosis y consecuencia del mecanismo de acción del principio activo y así, evitar los efectos tóxicos generados por la acumulación del fármaco o sus metabolitos; se debe ser muy cuidadoso con los medicamentos del grupo de las benzodiacepinas y neuromoduladores, ya que, su suspensión brusca puede generar efectos de rebote con exacerbación de la sintomatología del paciente [43].

En los pacientes metabolizadores rápidos debe efectuarse un incremento en la dosificación, previa medición de las concentraciones séricas de los fármacos utilizados, para lograr una adecuada biodisponibilidad del principio activo, reflejada en efectividad terapéutica y control clínico de los pacientes [43].

Los resultados obtenidos en este trabajo son importantes, puesto que, aporta conocimiento por ser el primer estudio centrado en pacientes con enfermedad de Huntington de la población mestiza de Juan de Acosta-Atlántico para establecer sus fenotipos

metabólicos extrapolados del genotipo del CYP2D6 que interviene en el metabolismo de los fármacos neurolépticos y antipsicóticos prescritos como la tetrabenazepina y la clozapina [44, 45].

## CONCLUSIONES

En la muestra poblacional del municipio de Juan de Acosta, el genotipo más representado fue el homocigótico para el alelo silvestre \*1/\*1 de CYP2D6\*3, la frecuencia esperada del genotipo \*4/\*4 fue de 9,3%, representando el 30,4% con el alelo mutado y por último, se encontró una alta frecuencia (26,1%) de individuos con la duplicación/multiplicación de alelos CYP2D6 activos, valor mayor a los reportados en poblaciones mestizas hispanoamericanas y muy superior a la obtenida dentro de la población colombiana. Esta información tiene aplicación potencial en la práctica médica porque CYP2D6 es crucial en el metabolismo de fármacos comúnmente prescritos en pacientes con enfermedad de Huntington, con la finalidad de reducir la incidencia de efectos adversos y aumentar el efecto terapéutico deseado.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar la investigación, incluyendo en una segunda fase estudios de biodisponibilidad de los fármacos utilizados por los pacientes vs. Polimorfismos del gen CYP2D6 para establecer correlaciones entre la variabilidad genética y la farmacoterapéutica (efectividad y seguridad), además de, incluir un grupo interdisciplinario que realice seguimiento farmacoterapéutico a los pacientes para influir de forma positiva en su estado de salud y calidad de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo reconocen y agradecen a la Universidad Libre seccional Barranquilla, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, a la Secretaría de Salud del Atlántico, a la Secretaría de Salud Municipio de Juan de Acosta y a la Fundación Enfermos de Huntington del Municipio de Juan de Acosta.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en conflicto.

## REFERENCIAS

1. M. Martín-Carrasco, Tetrabenazina en los trastornos del movimiento, *Psicogeriatría*, **2**(1), 3-14 (2010).
2. M. Ingelman-Sundberg, Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity, *Pharmacogenomics J.*, **5**(1), 6-13 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>
3. M.C. Ledesma, J.A. Agundez, Identification of subtypes of CYP2D gene rearrangements among carriers of CYP2D6 gene deletion and duplication, *Clin. Chem.*, **51**, 939-943 (2005).
4. A. Gaedigk, S.D. Simon, R.E. Pearce, L.D. Bradford, M.J. Kennedy, J.S. Leeder, The CYP2D6 activity score: Translating genotype information into a qualitative measure of phenotype, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **83**(2), 234-242 (2008).
5. A. Llerena, P. Dorado, R. Ramírez, I. González, M. Alvarez, E.M. Peñas-Lledó, *et al.*, CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans, *Pharmacogenomics J.*, **12**(2), 176-183 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.85>
6. A. Crescenti, S. Mas, P. Gassó, M. Baiget, M. Bernardo, A. La Fuente, Simultaneous genotyping of CYP2D6 \*3, \*5 and polymorphisms in a Spanish population through multiplex long polymerase chain reaction and minisequencing multiplex single base extension analysis. *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.*, **34**, 992-997 (2007).
7. D. Marez, M. Legrand, N. Sabbagh, *et al.*, Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a Europe population: Characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution, *Pharmacogenetics*, **7**, 193-202 (1997).
8. M. Hersberger, J. Marti-Jaun, K. Rentsch, E. Hänseler, Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex long PCR, *Clin. Chem.*, **46**(8), 1072-1077 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1072>
9. C. Flores, C. Villegas, Y. Mora, J.A. Martínez, T. Oropeza, N. Moreno, variantes alélicas de CYP2D6 en una muestra de residentes del estado Aragua, Venezuela,

- Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*, **32**(4), 746-751 (2015). Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmest.2015.324.1767>
10. F. Saghafi, E. Salehifar, G. Janbabai, E. Zaboli, A. Hedayatzadeh-Omran, O. Amjadi, S. Moradi, CYP2D6\*3 (A2549 del), \*4(G1846A), \*10(C100T) and \*17(C1023T) genetic polymorphisms in Iranian breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen, *Biomedical Reports*, **9**, 446-452 (2018).
  11. P. Dorado, M.C. Cáceres, E. Pozo-Guizado, M.-L. Wong, J. Licinio, A. Llerena, Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use, *BioTechniques*, **39**(4S), S571-S574 (2005). Doi: <https://doi.org/10.2144/000112044>
  12. R. Romero-Geraldo, N. Hernández-Saavedra, D. Fimbres-Olivarria, N. García-Lagunas, Validación de genes de referencia adecuados para la normalización de PCR cuantitativa en tiempo real de juveniles de *Crassostrea gigas* expuestos a dinoflagelados tóxicos, *Biotecnia*, **22**(2), 94-102 (2020). Doi: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1250>
  13. K. Puaprasert, C. Chu, N. Saralamba, *et al.*, Detección por PCR en tiempo real de variantes genéticas comunes de *CYP2D6* y su aplicación en un estudio de población de Karen, *Malar. J.*, **17**(1), 427 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2579-8>
  14. L. Excoffier, H.E.L. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.*, **10**(3), 564-567 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
  15. Funcionalidad del alelo CYP2D6. URL: [https://api.pharmgkb.org/v1/download/file/attachment/CYP2D6\\_allele\\_functionaly\\_reference.xlsx](https://api.pharmgkb.org/v1/download/file/attachment/CYP2D6_allele_functionaly_reference.xlsx). Consultado 4 marzo 2023.
  16. M. Kane, CYP2D6 Overview: Allele and Phenotype Frequencies, en: V.M. Pratt, S.A. Scott, M. Pirmohamed, *et al.* (editores), *Medical Genetics Summaries*, National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD), 2021. [Actualizado: 2021 Oct 15]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574601/>. Consultado 4 marzo 2023.
  17. M. Sosa-Macias, A. Llerena, Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations, *Drug Metabol. Drug Interact.*, **28**(4), 193-208 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1515/dmdi-2013-0037>



18. A. Hernández, L. Salamanca, F. Ruiz, *Los grupos étnicos en la Colombia de hoy: Colombia una Nación Multicultural. Su diversidad Étnica*, Capítulo 2, DANE, Bogotá, 2007.
19. D. Solano, S. Paolo, Indígenas, mestizajes, tierra y poder en el departamento del Atlántico (Colombia) durante el siglo XIX, en: *Boletín de Historia y Antigüedades de Sabanalarga, Atlántico*, Vol. 7, Noviembre 2016, pp. 24-54. URL: [https://www.researchgate.net/publication/319130538\\_Indigenas\\_mestizajes\\_tierra\\_y\\_poder\\_en\\_el\\_departamento\\_del\\_Atlantico\\_Colombia\\_durante\\_el\\_siglo\\_XIX\\_en\\_BOLETIN\\_DE\\_HISTORIA\\_Y\\_ANTIQUEDADES\\_DE\\_SABANALARGA\\_N\\_7\\_Sabanalarga\\_2016\\_pp\\_24-54](https://www.researchgate.net/publication/319130538_Indigenas_mestizajes_tierra_y_poder_en_el_departamento_del_Atlantico_Colombia_durante_el_siglo_XIX_en_BOLETIN_DE_HISTORIA_Y_ANTIQUEDADES_DE_SABANALARGA_N_7_Sabanalarga_2016_pp_24-54). Consultado 4 marzo 2023.
20. P. Grimán, Y. Moráni, M. Camargo, M.A. Chiurillo, Caracterización de variantes alélicas de Citocromo CYP2D6 en la población de la región centroccidental de Venezuela, *Acta Biol. Colomb.*, **14**(1), 195-202 (2000).
21. P.M. Casas, A.I. Zavaleta, V. Izaguirre, M. López, Bases moleculares de los principales polimorfismos del gen CYP2D6, diferencias étnicas y consecuencias farmacológicas, *Ciencia e Investigación*, **10**(2), 89-101 (2007).
22. A.P. Sarmiento, P. Dorado, A. Borbón, F. de Andrés, A. Llerena A, CEIBA Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF, High prevalence of CYP2D6 ultrarapid metabolizers in a mestizo Colombian population in relation to Hispanic mestizo populations, *Pharmacogenomics*, **21**(17), 1227-1236 (2020). Doi: <https://doi.org/10.2217/pgs-2020-0102>
23. C.A. Isaza, J. Henao, A.M. López, R. Cacabelos, Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **22**(9), 695-705 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1358/mf.2000.22.9.802286>
24. A. Gaedigk, K. Sangkuhl, M. Whirl-Carrillo, T. Klein, Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations, *Genetics in Medicine*, **19**(1), 69-76 (2017).
25. G. Bailliet, M.R. Santos, E.L. Alfaro, J.E. Dipierri, D.A. Demarchi, F.R. Carnese, N.O. Bianchi, Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay, *Mutat. Res.*, **627**(2), 171-177 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.005>

26. M. López, J. Guerrero, H. Jung-Cook, M.E. Alonso, CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **61**(10), 749-754 (2005).
27. C. Sachse, J. Brockmüller, S. Bauer, I. Roots, Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences, *Am. J. Hum. Genet.*, **60**(2), 284-295 (1997).
28. N. Sabbagh, A. Brice, D. Marez, A. Dürr, M. Legrand, J.M. Lo Guidice, *et al.*, CYP2D6 polymorphism and Parkinson's disease susceptibility, *Mov. Disord.*, **14**(2), 230-236 (1999).
29. E.A. Gaikovitch, I. Cascorbi, P.M. Mrozkiewicz, J. Brockmüller, R. Frötschl, K. Köpke, *et al.*, Polymorphisms of drug metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and p-glycoprotein in a Russian population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **59**(4), 303-312 (2003).
30. M.G. Scordo, A.P. Caputi, C. D'Arrigo, G. Favaa, E. Spina, Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in an Italian population, *Pharmacol. Res.*, **50**, 195-200 (2004).
31. A. Menoyo, E. Del Rio, M. Baiget, Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population, *Cell. Biochem. Funct.*, **24**(5), 381-385 (2006).
32. S. Muñoz, V. Vollrath, M.P. Vallejos, J.F. Miquel, C. Covarrubias, A. Raddatz, J. Chianale, Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile, *Pharmacogenetics*, **8**(4), 343-351 (1998). Doi: <https://doi.org/10.1097/00008571-199808000-00008>
33. C.G. Don, M. Smieško, Microsecond MD simulations of human CYP2D6 wild-type and five allelic variants reveal mechanistic insights on the function, *PloS One*, **13**(8), e0202534 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202534>
34. C. Céspedes-Garro, G. Jiménez-Arce, M.E. Naranjo, R. Barrantes, A. Llerena, CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF, Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans, *Rev. Biol. Trop.*, **62**(4), 1659-1671 (2014).

35. B. Almoguera, R. Riveiro-Alvarez, B. Gomez-Dominguez, R. Lopez-Rodriguez, P. Dorado, C. Vaquero-Lorenzo, *et al.*, Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: Screening in a Spanish population, *Pharmacogenomics*, **11**(11), 1619-1625 (2010). Doi: <https://doi.org/10.2217/pgs.10.131>
36. A. Llerena, P. Dorado, E.M. Peñas-Lledó, M.C. Cáceres, A. De la Rubia, Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients, *Pharmacogenomics J.*, **7**, 408-410 (2007).
37. L. Bradford, CYP2D6 al allele frequency in European Caucasians, Africans and their descendants, *Pharmacogenomics*, **3**(2), 229-243 (2002).
38. S. Bernard, K.A. Neville, A.T. Nguyen, D.A. Flockhart, Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: Clinical implications, *Oncologist*, **11**(2), 126-135 (2006). Doi; <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-2-126>
39. K. van der Weide, J. van der Weide, The influence of the CYP3A4\*22 polymorphism and CYP2D6 polymorphisms on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, pimozide, and risperidone in psychiatric patients, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **35**(3), 228-236 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000319>
40. A. Llerena, M.E.G. Naranjo, F. Rodrigues-Soares, E.M. Penas-Lledó, H. Fariñas, E. Tarazona-Santos, Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **10**(11), 1569-1583 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.964204>
41. P. Amariles-Muñoz, J.A. Hincapié-García, C.M. Jiménez-Estrada, F.J. Gutiérrez-Henao, N.A. Giraldo-Alzate, *Farmacoseguridad: Farmacovigilancia y Seguimiento Farmacoterapéutico*, Humax Pharmaceutical, Medellín, 2011.
42. H. Roblejo-Balbuena, Polimorfismos del gen CYP2D6 y su relación con la esquizofrenia, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba, 2015. 9 p.
43. I. D'Empaire, C.J. Guico-Pabia, S.H. Preskorn, Antidepressant treatment and altered CYP2D6 activity: Are pharmacokinetic variations clinically relevant? *J. Psychiatr. Prac.*, **17**(5), 330-339 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1097/01.pra.0000405363.95881.01>

44. L. Dean, Deutetrabenazine therapy and CYP2D6 genotype, en: N.M. Pratt, S.A. Scott, M. Pirmohamed, *et al.* (editores), *Medical Genetics Summaries*, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2019. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540716/> Consultado 4 marzo 2023.
45. L. Dean, M. Kane, Clozapine therapy and CYP genotype, en: N.M. Pratt, S.A. Scott, M. Pirmohamed, *et al.* (editores), *Medical Genetics Summaries*, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2016. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK367795/> Consultado 4 marzo 2023.

### CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.d.C. García-Cuan, J.A. Flórez-Cifuentes, M.F. Macías-Puente, J.A. Navarro-Navarro, F. Rondón-González, variantes alélicas de CYP2D6: \*3, \*4, \*5 y \*6 en pacientes con enfermedad de Huntington residentes en el municipio de Juan de Acosta, Atlántico (Colombia), *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 720-740 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.104393>

# Bone therapy through drug delivery of chelated [bisphosphonate-metal ions] adsorbed on the surface of carbon nanotubes

Fatemeh Mollaamin<sup>1</sup>, Majid Monajjemi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

\*Corresponding author e-mail: smollaamin@gmail.com

Received: August 6, 2022

Corrected: March 15, 2023

Accepted: March 22, 2023

## SUMMARY

**Aim:** To investigate a single-walled carbon nanotube (SWCNT) joint to bisphosphonate agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 chelated to metal cations of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  due to the direct electron transfer principle which has been studied by density functional theory methods. **Method:** It has been accomplished the B3LYP/6-311+G(d,p)/LANL2DZ to estimate the susceptibility of SWCNT for adsorbing 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 chelated to metal cations of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  through nuclear magnetic resonance and thermodynamic parameters. **Results:** The data explained that the feasibility of using SWCNT and bisphosphonate agents becomes the norm in metal chelating of delivery system, which has been selected through several bisphosphonate agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, and 2I19 using DFT method due to physico-chemical properties of NMR and IR methodologies.

**Keywords:** (5,5) armchair SWCNT, protein-bisphosphonate, metal chelating.

## RESUMEN

### Terapia ósea a través de la administración de fármacos tipo quelatos [iones bisfosfonato-metal] adsorbidos en la superficie de nanotubos de carbono

**Objetivo:** investigar la unión de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) con agentes bisfosfonatos de 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 quelados con cationes metálicos de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  debido al principio de transferencia directa de electrones que tiene ha sido estudiado por métodos de la teoría funcional de la densidad. **Método:** se ha realizado el B3LYP/6-311+G(d,p)/LANL2DZ para estimar la susceptibilidad de SWCNT para adsorber 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 quelados a cationes metálicos de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  mediante resonancia magnética nuclear y parámetros termodinámicos. **Resultados:** los datos explicaron que la viabilidad de usar SWCNT y agentes bisfosfonatos se convierte en la norma en el sistema de entrega de quelación de metales, que ha sido seleccionado a través de varios agentes bisfosfonatos de 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92 y 2I19 usando el método DFT debido a propiedades fisicoquímicas de los métodos de RMN e IR.

**Palabras clave:** (5.5) sillón SWCNT, proteína-bifosfonato, quelación de metales.

## RESUMO

### Terapia óssea por meio de administração do quelatos [íons bifosfonato-metal] adsorbidos na superfície de nanotubos de carbono

**Objetivo:** investigar os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) unidos a agentes bifosfonatos de 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 quelatados a cátions metálicos de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  devido ao princípio de transferência direta de elétrons que tem sido estudado por métodos da teoria do funcional da densidade. **Método:** foi realizado o B3LYP/6-311+G(d,p)/LANL2DZ para estimar a suscetibilidade do SWCNT para adsorver 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 quelatados a cátions metálicos de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  por ressonância magnética nuclear e parâmetros termodinâmicos. **Resultados:** os dados explicaram que a viabilidade do uso de agentes SWCNT e bisfosfonatos se torna a norma no sistema de entrega de quelante de metal, que foi selecionado por meio de vários agentes bisfosfonatos de

5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92 e 2I19 usando o método DFT devido a propriedades físico-químicas de metodologias de RMN e IV.

**Palavras-chave:** (5,5) poltrona SWCNT, proteína-bifosfonato, quelantes de metais.

## INTRODUCTION

Bone tissue tolerates constant rebuilding and achieves the equilibrium by osteoblasts producing bone and osteoclasts destroying bone. The compounds of bisphosphonates keep from the digestion of bone by pushing osteoclasts to bear cell death or the apoptosis, which diminish the velocity of bone destroying [1].

The principal impact of the active bisphosphonates is to prevent bone resorption. In fact, these structures manifest to be strong inhibitors of resorption when experimented in various conditions of in vivo and in vitro. Bisphosphonate compounds stop bone resorption produced by different reasons in cell and organ. They prevent forming the holes by isolated osteoclasts on mineral layers [2].

Generally, the physicochemical impacts of bisphosphonates are very close to those of pyrophosphate. Therefore, they prevent the formation, postpone the association, and decrease the dissolution of calcium phosphate compounds. All these impacts depend on the identified intention of these structures for solid-phase calcium phosphate, on the surface of which they attach extremely. This notable characteristic is the basis for the employment of these structures as skeletal markers in nuclear medicine and the foundation for their selective localization in bone when employed as the drugs. There is an attention to enhancing the bioavailability and duration of action of a drug to modify therapeutic consequences. Drug delivery technique is able to change a drug's pharmacokinetics and specificity by formulating it with various ingredients, drug carriers, and medical equipment [3-7].

Nanomedicine covers a wide range of therapeutic applications, from nanoparticulate drug delivery systems including carbon nanotubes, layered double hydroxides, to in vitro (biosensor) and in vivo (imaging and implantable devices) diagnostics [8-13]. Nanomedicine in drug delivery is for achieving the improved delivery of water insoluble drugs, delivery of large macromolecule drugs to intracellular sites of action, and codelivery of two or more drugs or therapeutic agents for combination remedy [14-16]. Since the exploring CNTs in 1990s and the progress of their application in nanomedicine, these compounds are significant through their properties including rich electronic and thermal factors, great mechanical strength, high chemical stability, and

extremely lightweight [17-19]. These carriers indicate the capability for transferring the therapeutic agents such as proteins, DNA, antibodies and drugs on the external wall or by trapping in the cavity nanotubes as a capsule [20-22].

Nanotubes with their intrinsic properties have been considered potential candidates for drug delivery carriers. The capped ends of nanotubes may be opened up by oxidation, allowing for the insertion of molecules of interest inside the nanotube. Carbon nanotubes (CNTs) can easily penetrate cells, delivering drugs directly to the cytoplasm or nucleus.

CNTs are large molecules that are built by repeating pattern of  $sp^2$  hybridized carbon atoms in a hexagonal composition, rolled into a cylinder of approximately 2.5-100 nm in diameter. CNTs are long and tubular fullerene structures, which can be either single-walled (SWCNTs) or multiwalled (MWCNTs). SWCNTs are formed by a rolling single layer of graphite cylinder with a tube diameter of approximately 0.4-2 nm, but MWCNTs are multiple concentric cylindrical shells of graphite layers with the distance about 0.36 nm and diameters about 2-100 nm. Nanotubes conform to a perpendicular position with the cell membrane during uptake, perforating and diffusing through the lipid bilayer to enter the cytoplasm. Functionalized CNTs are easily internalized by cells through passive and endocytosis-independent mechanisms [1-6].

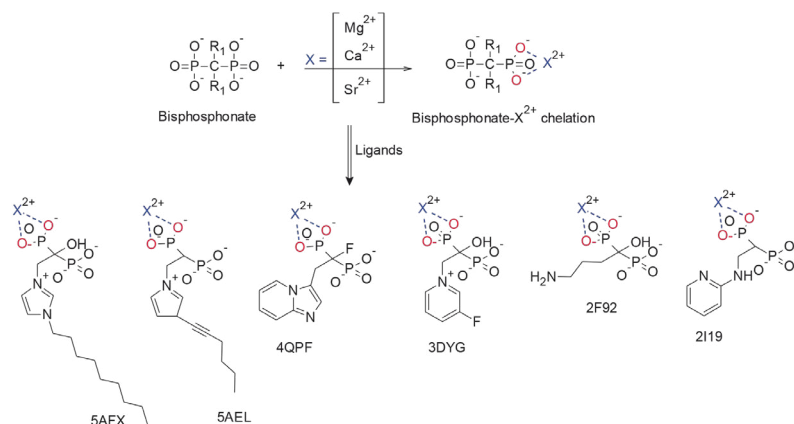
The bone cells in human body are gradually being continually taken away and substituted with new ones by osteoblast in the total life. The bisphosphonates behave by reducing osteoclast activity and then reducing the overturn of bone or replacement of the old bone cell. Since we start being old and in particular, a disease, the bone is really being damaged or removed more quick than our body can substitute it. This makes the bones weakened, thin and much easily to break with even a small impact or a fall from a standing height. Therefore, bisphosphonate medications support us to keep the bone density and bone strength.

In fact, the most popular bisphosphonate medications have a rich tension for metal cations, among them  $Ca^{2+}$ , with which they can produce both soluble and insoluble compounds and aggregates, depending on the pH of the solution and the metal exist. The bisphosphonates are separated into chemical branches based on the side chains of R1 and R2. It is seen a central carbon in bisphosphonates with two side chains of R1, R2 and two phosphate branches which are bonded to  $Ca^{2+}$  through O- of  $PO_3$  groups for keeping a high amount of  $Ca^{2+}$  in bones of human body cells (Scheme1) [23-29].

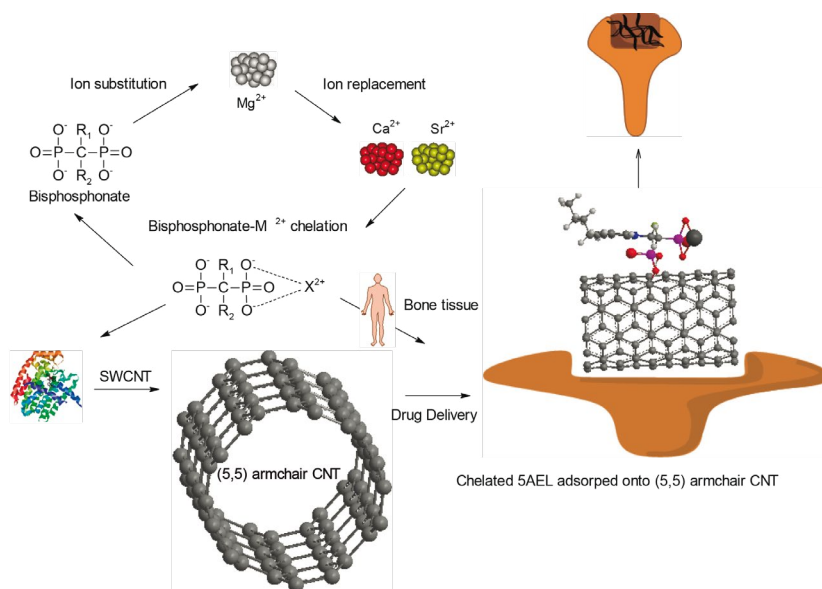
In this article, we have focused more on recent bisphosphonate drugs such as 5AEL, 5AFX,4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 which have been chelated with  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Si^{2+}$  adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT, respectively (Scheme1). This new generation of



bisphosphonates agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 as second and third generation of bisphosphonates consist of nitrogen atoms in side chain of R2 for promoting osteoclast apoptosis (Scheme1). Therefore, sick obtain the cure with more intense nitrogen bisphosphonates rather than the earlier non nitrogen bisphosphonates.



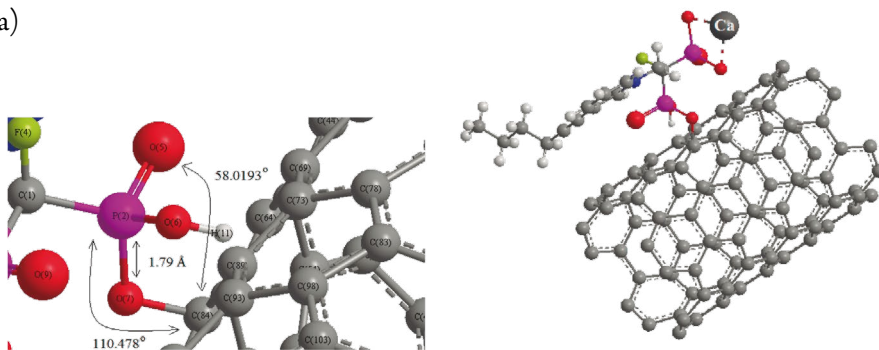
**Scheme 1.** Proposed mechanism of bisphosphonate- metal cation chelation of  $Mg^{2+}/Ca^{2+}/Sr^{2+}$  through the  $O^-$  of two  $PO_3$  (phosphonate) groups covalently linked to carbon for six ligands of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92 and 2I19.



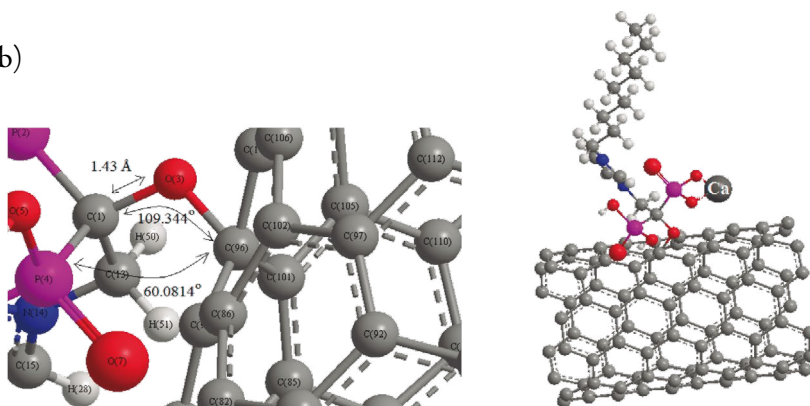
**Scheme 2.** Drug delivery of (5,5) armchair-SWCNT jointed with bisphosphonate agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 chelated with  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  in the bone of human body.

The chelation of bisphosphonate agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 with  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  has been investigated in this study by forming relatively stable drugs for adsorption onto (5,5) armchair CNT as a drug deliver (Scheme2). Thus, a series of quantum theoretical approaches has been accomplished for finding the optimized coordination of [bisphosphonate-  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  - (5,5) armchair CNT] chelation with DFT method of computations using Gaussian09 program package (Figure1) [30].

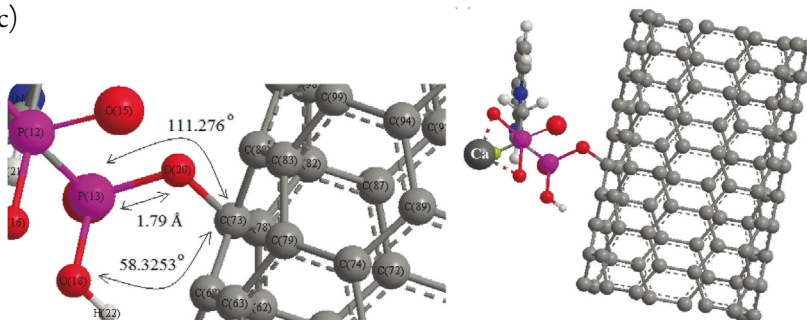
(a)

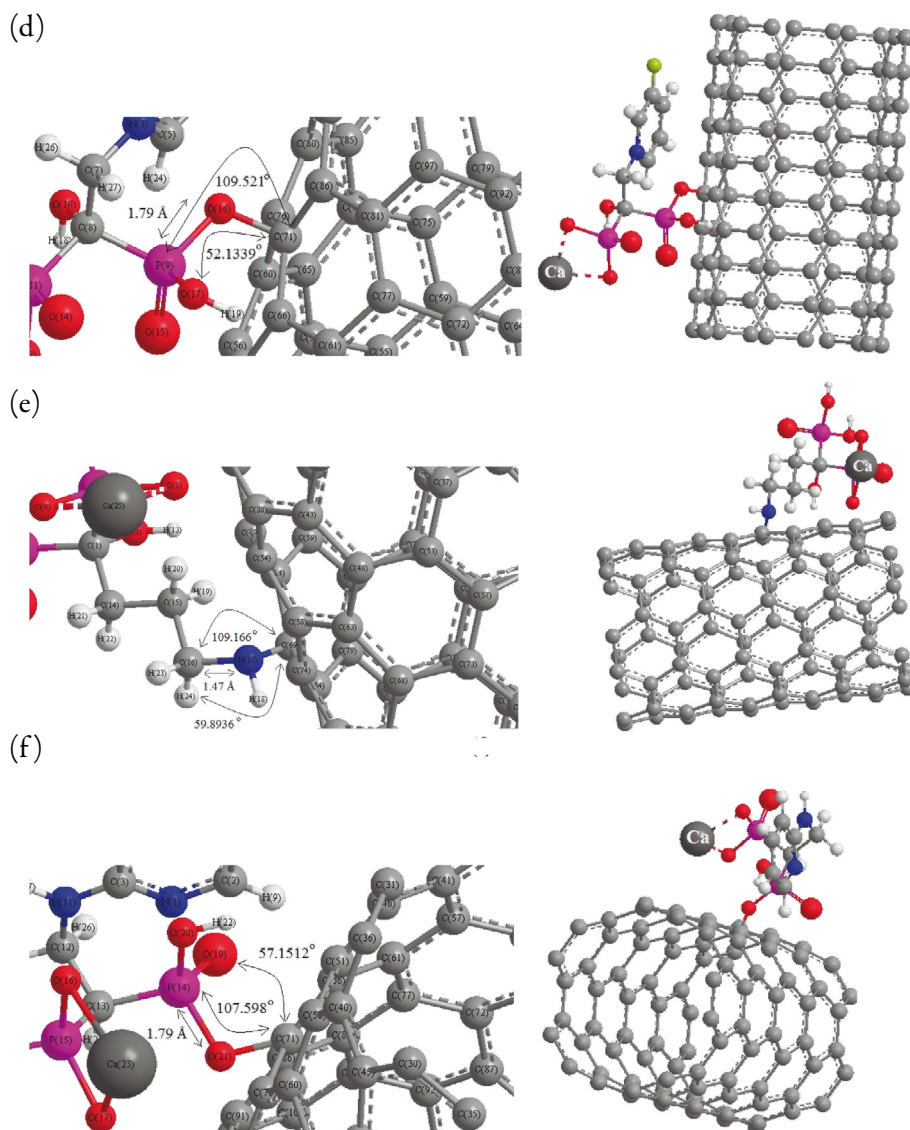


(b)



(c)





**Figure 1.** Adsorption of a) 5AEL, b) 5AFX, c) 4QPF, d) 3DYG, e) 2F92, f) 2I19 chelated with  $\text{Ca}^{2+}$  onto surface of (5,5) armchair CNT.

## THEORETICAL BACKGROUND AND COMPUTATIONAL METHOD

The density functional theory (DFT) is one of the most employed approximations of Hohenberg, Kohn and Sham, which permit the theoretical study of material properties [31]. DFT theory proves an advantageous method for predicting chemical systems, and in order to understand its similarities and differences to other computational methods employed.

In this study, the geometries were optimized at the framework of DFT using the three-parameter Becke's exchange [32, 33] and Lee-Yang-Parr's correlation non-local functional [34, 35], usually known as B3LYP method and basis sets of  $\text{Inl2dz}$  for metal cations of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  and  $6\text{-}311\text{+G}(2\text{d,p})$  for other atoms including H,C,N,O,F,P. Then, it has been described the electronic structure of adsorbed (5,5) armchair SWCNT by bisphosphonate agents of 5AEL, 5AFX,4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 chelated with  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  for measuring physico-chemical properties (Figure 1).

In this investigation, the Onsager model has been accomplished that was developed by Frisch, Wong and Wiberg utilizes spherical cavities. Even though this implies a less accurate description of the solute-solvent interface, this approximation simplifies the evaluation of energy formatives in geometry optimizations, and frequency analysis. Moreover, Cramer and Truhlar improved this model at dipole level [36-40]. In fact, a cavity must have a physical sense such as Onsager model, and has a mathematical ability as often happened in other descriptions of solvent impacts [41]. Specially, the cavity has to keep out the solvent and including its frontiers as the biggest probability part of the solute charge distribution [41].

Then, The gauge including atomic orbitals (GIAO) has been adopted to solve the gauge problem in the calculation of nuclear magnetic shielding for the complexes of 5AEL, 5AFX,4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 chelated with  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT using density functional theory (DFT) calculations.

These new drugs have been used for new lower bone tendency of bisphosphonate drug design which is sufficient curing diseases identifying by abnormal bone resorption (4QPF). The progress of selective protein farnesyl transferase (FTase) and protein geranylgeranyl transferase (GGTase) inhibitors as anticancer therapeutic agents has explored 3DYG which is more efficient than current bisphosphonate drugs [42]. 2I19 is a solid-state (13)C, (15)N, and (31)P magic-angle sample spinning (MAS) NMR and quantum chemical study of several bisphosphonates as pure structures and bonded

to FPPS for preparing data collection about side chain and phosphonate backbone protonation states when bind to the enzyme [43]. It has been indicated the consequences of many potential prenyl synthase inhibitors against *Trypanosoma brucei* farnesyl diphosphate synthase (TbFPPS) and against *T. brucei*, the causative agent of human African trypanosomiasis. 5AFX is one of the most powerful compounds lipophilic analogs of the bone resorption medication of zoledronate family [44]. 2F92 has been attained by solving the crystal structures of human farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) in its unliganded state, in complex with the nitrogen containing bisphosphonate (N-BP) medications of, alendronate, ibandronate, pamidronate, zoledronate which prepare a new achieving of the mechanism of FPPS catalysis and inhibition [45].

A type of linkage of molecules to metal ions is chelation which defines the presence of two or more coordinated bonds between a multiple bonded ligand that are known chelating or sequestering agents and a single central metal atom. Chelation can be used between drugs and metal ions. For example, antibiotic drugs of the tetracycline and quinolone families are chelating agents of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Mg}^{2+}$  ions [46, 47].

The chelation of bisphosphonates with cations in bone cells has been accomplished in this research by forming relatively stable complexes. Therefore, a group of quantum theoretical methods has been run for exploring the optimized structures of [bisphosphonate-cations of  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ ] cluster chelation adsorbed onto the surface of (5,5) armchair SWCNT as the drug delivery method in human bone with thermodynamic calculations and nuclear magnetic resonance analysis using Gaussian 09 program software [30, 48].

## RESULTS AND DISCUSSION

CNTs are representing drug delivery platforms that can be functionalized with various biomolecules including antibodies, proteins, and DNA. This permits the particular targeted for transferring the special tissues, organs, or cells. These compounds can easily penetrate cells, delivering drugs directly to the cytoplasm or nucleus. Drug delivery systems improve the pharmacological and therapeutic profile and efficacy of the drug and lower the occurrence of off-targets.

### *NMR analysis*

The NMR data of isotropic ( $\sigma_{\text{iso}}$ ), anisotropic shielding tensor ( $\sigma_{\text{aniso}}$ ), and eigenvalues of chemical shielding including  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$  for 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT, respectively, have been estimated (Table 1).

**Table 1.** SCF GIAO Magnetic shielding tensor for 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 in ppm chelated with cations at the adsorption site onto (5,5) armchair SWCNT.

5AEL	P2	P3	F4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	N12
ppm										
$\sigma_{11}$	120.7202	230.1554	435.8378	-845.9768	294.3757	235.7504	288.5618	-865.3928	282.1969	248.4936
$\sigma_{22}$	326.5601	360.4257	500.6499	-748.7844	339.1351	291.7178	343.2284	-381.6224	342.2235	254.9154
$\sigma_{33}$	586.9049	556.1500	504.5664	315.9052	403.8328	399.1250	398.4050	188.4803	396.1588	315.8979
$\sigma_{iso}$	344.7284	382.2437	480.3514	-426.2854	345.7812	308.8644	343.3984	-352.8449	340.1931	273.1023
$\sigma_{aniso}$	363.2648	260.8594	36.3226	1113.2858	87.0774	135.3909	82.5099	811.9879	83.9487	64.1933
5AFX										
ppm	P2	O3	P4	O5	O6	O7	O8	O9	N12	N15
$\sigma_{11}$	493.0153	347.4844	489.2774	367.7419	355.8661	195.7888	348.2661	348.5479	275.3916	252.7710
$\sigma_{22}$	535.3338	352.3542	543.7332	406.9306	384.9345	418.3030	379.6779	382.8813	297.8433	275.4504
$\sigma_{33}$	732.1662	405.8583	733.5645	478.7720	452.7585	452.7278	451.8487	459.2721	308.5416	280.4190
$\sigma_{iso}$	586.8385	368.5656	588.8584	417.8149	397.8530	355.6065	393.2642	396.9004	293.9255	269.5468
$\sigma_{aniso}$	217.9917	55.9390	217.0592	91.4357	82.3582	145.6819	87.8767	93.5575	21.9241	16.3083
4QPF										
ppm	N1	N9	P12	P13	F14	O15	O16	O17	O18	O19
$\sigma_{11}$	166.6870	-120.2309	371.2924	358.5225	406.5801	185.5508	276.8187	255.1893	185.6137	248.4056
$\sigma_{22}$	186.8310	80.5403	503.9686	498.5045	498.5821	332.2648	341.4780	322.6068	320.2219	337.7732
$\sigma_{33}$	291.5409	299.1759	577.4020	574.9991	567.7987	413.9534	417.7479	396.9123	394.3093	420.6935
$\sigma_{iso}$	215.0196	86.4951	484.2210	477.3420	490.9870	310.5896	345.3482	324.9028	300.0483	335.6241
$\sigma_{aniso}$	114.7819	319.0212	139.7714	146.4856	115.2175	155.0456	108.5995	108.0142	141.3915	127.6041

(Continued)

<b>3DYG</b>	N3	P9	O10	P11	O12	O13	O14	O15	O16	F18
ppm	272.2813	468.8130	307.8918	494.3100	330.5002	344.9279	175.2842	134.7427	326.4399	252.6723
$\sigma_{11}$	285.0418	583.9536	335.7405	574.0939	347.2339	351.1869	441.7081	417.8427	351.6728	454.1963
$\sigma_{33}$	304.0441	785.9277	410.4521	740.6575	428.8972	427.1516	497.7941	502.7569	456.0036	627.1797
<b>3DYG</b>										
$\sigma_{iso}$	287.1224	612.8981	351.3615	603.0205	368.8771	374.4222	371.5955	351.7808	378.0388	444.6828
$\sigma_{aniso}$	25.3825	259.5444	88.6359	206.4555	90.0302	79.0942	189.2979	226.4642	116.9472	273.7454
<b>2F92</b>										
ppm	P2	O3	P4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	N14
$\sigma_{11}$	129.2678	327.5810	124.9174	285.3878	286.3320	-785.0432	287.4519	293.0829	-819.4334	273.0277
$\sigma_{22}$	324.5278	354.8863	341.2007	349.7245	344.7701	-699.3138	340.8483	341.6639	-729.5357	304.4646
$\sigma_{33}$	582.9983	397.7685	557.8503	424.7552	409.7726	323.2857	404.3027	404.4552	321.4145	317.5097
$\sigma_{iso}$	345.5979	360.0786	341.3228	353.2892	346.9582	-387.0238	344.2010	346.4007	-409.1849	298.3340
$\sigma_{aniso}$	356.1005	56.5349	324.7913	107.1991	94.2215	1065.4642	90.1526	87.0818	1095.8991	28.7636
<b>2I19</b>										
ppm	N1	N7	P10	P11	O12	O13	O14	O15	O16	O17
$\sigma_{11}$	-110.1587	266.0135	124.5896	317.4599	261.2164	277.3089	-1116.5483	-804.1879	294.1071	293.5133
$\sigma_{22}$	74.1505	291.1718	337.2575	380.6968	325.1630	323.4823	-164.9932	-716.7470	346.6974	346.7134
$\sigma_{33}$	340.0101	343.8731	583.1254	644.4727	371.1527	367.3362	432.5164	321.0844	410.5222	415.7349
$\sigma_{iso}$	101.3340	300.3528	348.3242	447.5432	319.1774	322.7091	-283.0084	-399.9502	350.4423	351.9872
$\sigma_{aniso}$	358.0142	65.2805	352.2019	295.3944	77.9630	66.9405	1073.2871	1081.5518	90.1200	95.6216

The computed results have indicated the SCF GIAO Magnetic shielding tensor in ppm for oxygen, nitrogen, fluorine, and phosphorus exploring the active site of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 complexes of bisphosphonate agents as the drugs for osteoporosis and similar diseases cure. The calculations have been accomplished based on B3LYP/6-311+G (2d,p) level of theory using Gaussian 09 program software [30] and reported in Table 1.

The agents of 5AEL, 4PF, 2F92, 2I19 have approximately shown the identical behavior for various atoms in the active sites of these compounds through the NMR properties (Figure 2a). The bisphosphonate agents of 3DYG, 5AFX have also the similar fluctuation in the magnetic shielding tensor (Figure 2b).

Moreover, the  $^{13}\text{C}$ -NMR measurements on 2F92 and 2I19 bisphosphonate agents have demonstrated the active sites of these compounds exploring the most electronegative atoms for adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT which represent the maximal shift in TMS B3LYP/6-311+G(2d,p) (Figure 2 c,d).

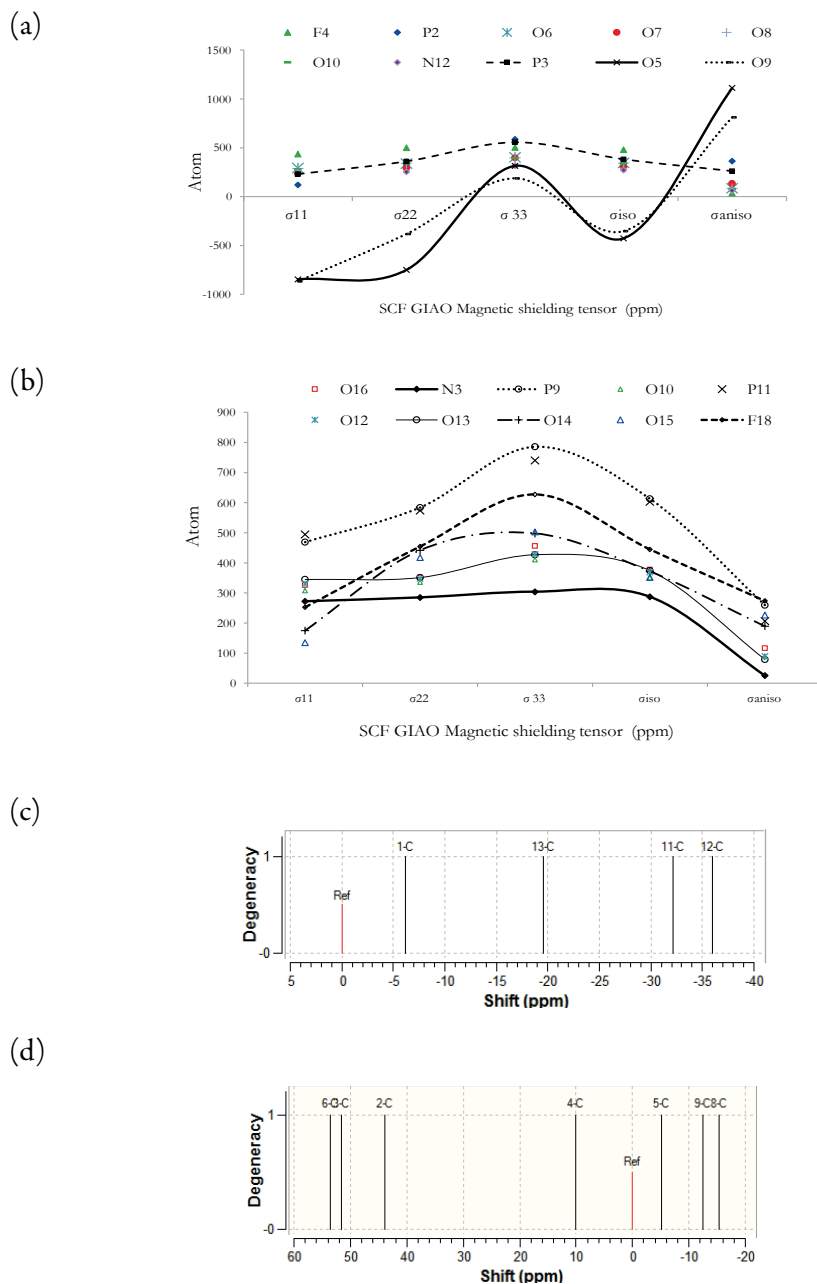
The CS tensors are yielded by the quantum chemical calculations in principal axes system to estimate the isotropic chemical-shielding (CSI) and anisotropic chemical-shielding (CSA):

$$\text{CSI (ppm)} = (\sigma_{33} + \sigma_{22} + \sigma_{11})/3 \quad (1)$$

$$\text{CSA (ppm)} = \sigma_{33} - (\sigma_{22} + \sigma_{11})/2 \quad (2)$$

Besides, the Onsager model has influenced on the nuclear magnetic resonance data and chemical shielding of H,C,N,O,F,P atoms in 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 (Figures 2a, 2b). It has been indicated that oxygen atom in 5AEL, 4PF, 2F92, 2I19 (Figure 2a) and nitrogen atom in 3DYG, 5AFX (Figure 2b) has the most effect on the NMR shielding which direct us toward the active site for adsorption onto (5,5) armchair SWCNT.

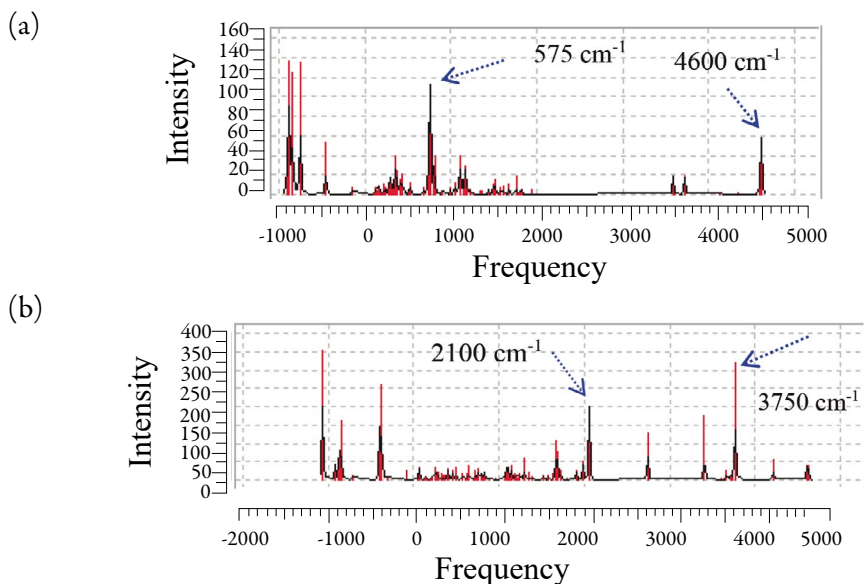




**Figure 2.** The NMR plot of isotropic ( $\sigma_{iso}$ ), anisotropic ( $\sigma_{aniso}$ ) and eigenvalue shielding tensors ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) calculated by level of theory B3LYP/6-311+G(2d,p) for a) 5AEL and similar behavior of 4PF; b) 3DYG and similar behavior for 5AFX in ppm adsorbed site onto (5,5) armchair SWCNT. c) TMS B3LYP/6-311+G(2d,p) for 2F92, d) TMS B3LYP/6-311+G(2d,p) for 2I19.

*IR method*

The infrared (IR) calculations have been accomplished for bisphosphonate agents adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT using B3LYP method and basis sets of In12dz for metal cations of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  and 6-311+G(2d,p) for other atoms including H,C,N,O,F,P to obtain the more accurate equilibrium geometrical parameters, thermodynamic properties and data for each of the determined structure. The IR spectrum for each of two bisphosphonate agents of 2F92 and 2I19 has been seen in the frequency range about  $300\text{ cm}^{-1}$  -  $4700\text{ cm}^{-1}$  and  $1000$  -  $4600\text{ cm}^{-1}$ , respectively (Figure 3). Figure 3a has shown the strongest allowed peaks about  $350$ ,  $750$ ,  $1100$ ,  $4600\text{ cm}^{-1}$  for 2F92 agent and Figure 3b has indicated the highest frequency at  $2100$ ,  $2750$ ,  $3750$ ,  $3400\text{ cm}^{-1}$  for 2I19, respectively.



**Figure 3.** Calculated IR intensity (km/mol) versus frequency ( $\text{cm}^{-1}$ ) through the IR spectra for a) 2F92 and b) 2I19 of bisphosphonate agents adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT using 6-311+G(2d,p) calculations.

The perspective of Figure 3 recommends the reason for existing observed various results of [5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19-  $Mg^{2+}$ /  $Ca^{2+}$ / $Sr^{2+}$ ] complex chelation adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT which present the position of active sites of labeled nitrogen, phosphorus, oxygen, fluorine, and metal cations of magnesium, calcium and strontium in these molecules which move the charge of electrons in polar bisphosphonates toward (5,5) armchair carbon nanotube.

**Table 2.** Calculated functions of harmonic frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ ), IR intensities ( $\text{km/mol}$ ) in different normal modes; thermodynamic properties of  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  in  $\text{kcal/mol}$  and  $\Delta S$  in  $\text{cal/mol.K}^{-1}$  at 300 K and optimized energy of UV-Vis.

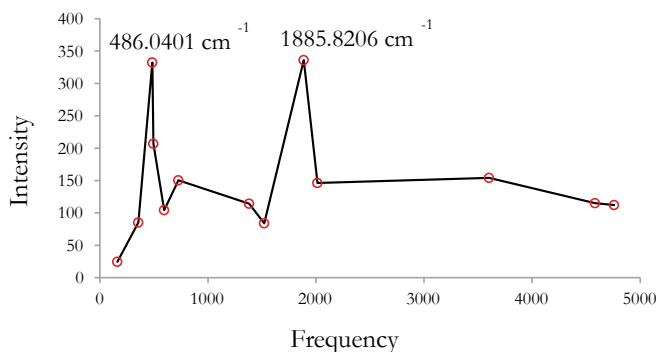
Compounds	Normal mode	IR Intensity( $\text{km/mol}$ )	Frequency( $\text{cm}^{-1}$ )	$\Delta G \times 10^{-3}$ ( $\text{kcal/mol}$ )	$\Delta H \times 10^{-3}$ ( $\text{kcal/mol}$ )	$\Delta S$ ( $\text{cal/K.mol}$ )	$E_{\text{UV-Vis}} \times 10^{-3}$ ( $\text{kcal/mol}$ )
4QPF	26	24.4465	162.0906				
	31	85.3674	356.5734				
	34	332.3113	486.0401				
	35	207.0099	496.4700				
	38	104.2123	595.6733				
	45	150.3644	727.1768				
	66	114.3697	1381.9960	-1045.171	-1045.139	107.498	-111.235
	69	83.8321	1520.5128				
	76	336.2025	1885.8206				
	79	146.3144	2013.8536				
	82	154.2183	3602.2892				
	90	115.0426	4581.3062				
92	112.2436	4757.1660					
2F92	33	27.6636	740.9208				
	34	100.7688	761.2168				
	37	38.7864	810.6012				
	41	38.6270	1101.6055	-879.212	-879.175	125.093	-86.308
	42	36.8377	1115.9542				
	44	29.6993	1170.0478				
58	19.0716	1758.7708					

(Continued)

Compounds	Normal mode	IR Intensity(km/mol)	Frequency( $\text{cm}^{-1}$ )	$\Delta G \times 10^{-3}$ (kcal/mol)	$\Delta H \times 10^{-3}$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/K.mol)	$E_{\text{UV-Vis}} \times 10^{-3}$ (kcal/mol)
2119	27	28.6466	399.0835				
	29	34.5129	500.8238				
	33	40.0477	652.4504				
	38	28.0249	789.6133				
	45	32.7104	1084.1391				
	47	31.9705	1110.2915				
	49	38.2129	1142.3353				
	54	57.6366	1302.2768		-936.225	119.524	-94.414
	62	106.4028	1673.4444				
	63	75.6871	1681.3981				
	67	49.6146	1986.3383				
	68	200.6094	2058.2918				
	69	126.8656	2742.2821				
	70	173.2174	3408.0867				
76	320.7285	3765.4924					

Figure 3 demonstrates the relationship between intensity and frequency of 2F92 and 2I19 bisphosphonate agents in different normal modes of sharp peaks at B3LYP/6-311+G(2d,p) method. The calculations of the relative harmonic frequencies, IR intensities, and  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  for active points of Pyridine and four derivatives of 4QPF, 2F92, 2I19 proteins have been reported in Table 2 and plotted in Figures 3 and 4.

It has been notable that polarization functions into the applied basis set in the computations always exist a significant achievement on the simulation and modeling methods of theoretical levels. The normal mode of spectra is exploring of harmonic potential wells by analytic methods which keep the movement of all atoms at the same time in the vibration time scale leading to a natural definition of molecular vibrations (Figure 4).



**Figure 4.** Calculated IR intensity (km/mol) versus frequency ( $\text{cm}^{-1}$ ) for 4QPF bisphosphonate agent adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT using 6-311+G(2d,p) calculations.

Therefore, the physico-chemical properties of relative energy (kcal/mol), virial coefficient ( $-V/T$ ) and dipole moment (Debye) have determined the stability of bisphosphonate agents among [5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19-  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ ] complex chelation adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT as the drugs for preventing the loss of bone cells, cure osteoporosis and other related diseases through the chelated bonding of these compounds with metal cations of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  using the drug design method (Table 3 and Figure 5).

The calculated properties describe solubility and permeability for selected bisphosphonates through biological membranes that appear as efficient bioavailability indicators of investigated bisphosphonates, which can be a sufficient methodology to consider in Biopharmaceutical Classification System (BCS) progress.

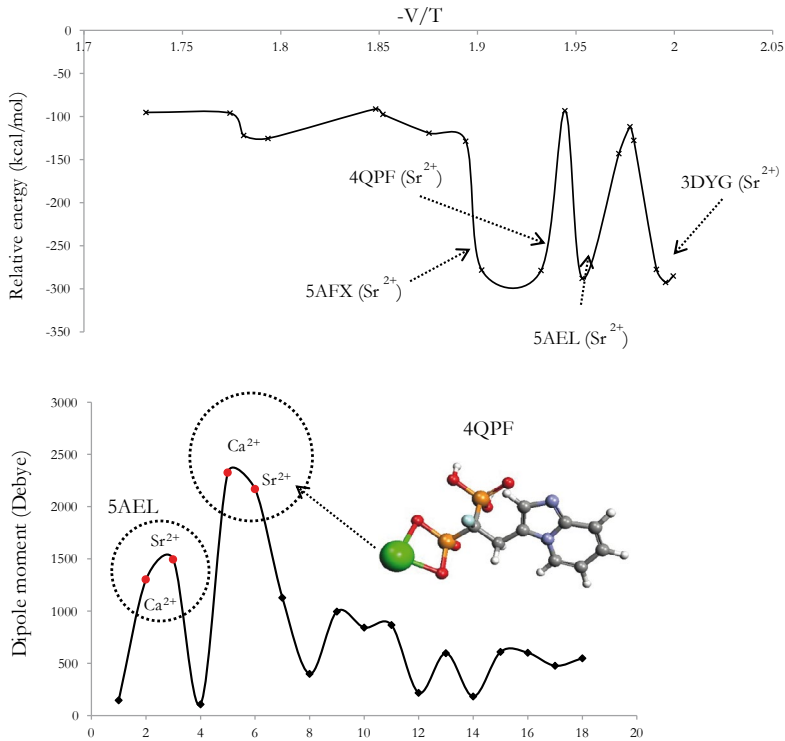
**Table 3.** Thermo-physical characteristics of chelated agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 with metal cations of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT at 300 K.

Agent	Metal cation	Relative energy ×10 <sup>-4</sup> (kcal/mol)	Virial coefficient (-V/T)	Dipole moment (Debye)
5AEL	Mg <sup>2+</sup>	-96.1388	1.7742	145.3358
	Ca <sup>2+</sup>	-121.9901	1.7812	1300.1667
	Sr <sup>2+</sup>	-287.8302	1.9532	1493.9256
5AFX	Mg <sup>2+</sup>	-95.3258	1.7315	107.7522
	Ca <sup>2+</sup>	-125.3981	1.7935	2324.3810
	Sr <sup>2+</sup>	-278.3101	1.9021	2167.8034
4QPF	Mg <sup>2+</sup>	-111.8961	1.9775	1129.6319
	Ca <sup>2+</sup>	-143.1309	1.9718	400.0616
	Sr <sup>2+</sup>	-278.6289	1.9322	996.8129
3DYG	Mg <sup>2+</sup>	-97.5459	1.8519	842.3853
	Ca <sup>2+</sup>	-128.6732	1.8940	866.5176
	Sr <sup>2+</sup>	-292.4445	1.9955	218.6805
2F92	Mg <sup>2+</sup>	-93.4189	1.9444	597.7910
	Ca <sup>2+</sup>	-127.7160	1.9794	182.2738
	Sr <sup>2+</sup>	-277.3898	1.9909	609.9441
2I19	Mg <sup>2+</sup>	-91.2341	1.8483	601.3917
	Ca <sup>2+</sup>	-119.3336	1.8754	476.6908
	Sr <sup>2+</sup>	-285.0652	1.9994	548.9973

Figure 5 has exhibited that the six atoms of oxygen in each site of the bisphosphonate agents chelated to metal cations of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> in 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2I19, 2F92 drugs have been minimized by ab-initio method using DFT level which includes ECP calculations with theoretical levels of LANL2DZ for metal elements.

Strontium (Sr) is known for its capability to increase bone and teeth mineralization, osteogenesis, and angiogenesis and downgrading osteoclast activity. This element as one of the main compounds of the bone tissues has a direct impact on metabolism of the bone. For improving bone cure, various investigations have concentrated on the substitution of calcium ions by strontium ions in the structure of bioactive glasses, which can be used for cure of vertebral complex fractures.

The results of the above observations strongly suggest that the different data observed of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2I19, 2F92 in the solvent is predominantly due to basis set functions are induced by a change in polarity of the environment. It is clear that an increase in the dielectric constants increases the stability and efficiency of these bisphosphonate drugs for preventing the loss of bone density and osteoporosis remedy [49-53].



**Figure 5.** a) Relative energy versus Virial coefficient ( $-V/T$ ) b) Dipole moment changes for chelated agents of 5AEL, 5AFX, 4QPF, 3DYG, 2F92, 2I19 with metal cations of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  adsorbed onto (5,5)-SWCNT.

## CONCLUSION

Bisphosphonate agents have attracted much attention for the clinical treatment of some skeletal diseases depicted by enhancing of osteoclast-mediated bone resorption. According to this research, by incorporation of chelated magnesium, calcium and strontium ions to bisphosphonate drugs adsorbed onto (5,5) armchair SWCNT, the network compaction would increase owing the larger atomic radius of strontium atom rather than calcium and magnesium, respectively. For improving bone cure, various investigations have concentrated on the substitution of calcium ions by strontium ions in the structure of bioactive glasses, which can be used for cure of vertebral complex fractures.

## CONFLICT OF INTEREST

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

## REFERENCES

1. M. Kistler-Fischbacher, B.K. Weeks, B.R. Beck, The effect of exercise intensity on bone in postmenopausal women (part 2): A meta-analysis, *Bone*, **143**, 115697 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115697>
2. K.E. Åkesson, F.E.A. McGuigan, Closing the osteoporosis care gap, *Curr. Osteoporos. Rep.*, **19**, 58-65 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11914-020-00644-w>
3. G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Banerjee, Drug delivery systems: An updated review, *Int. J. Pharm. Investig.*, **2**(1), 2–11 (2012). Doi: <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
4. J. Li, M. Zeng, H. Shan, C. Tong, Microneedle patches as drug and vaccine delivery platform, *Curr. Med. Chem.*, **24**(22), 2413–2422 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170526124053>
5. R.K. Tekade (editor), *Basic fundamentals of drug delivery*, Academic Press, 2018.
6. T.M. Allen, Drug delivery systems: Entering the mainstream, *Science*, **303**(5665), 1818–1822 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
7. A.P. Singh, A. Biswas, A. Shukla, P. Maiti, Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles, *Sig. Transduct. Target. Ther.*, **4**(1), 33 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0068-3>
8. S.M.N. Mohsin, M.Z. Hussein, S.H. Sarijo, S. Fakurazi, P. Arulselvan, Y.H. Taufiq-Yap, Characterisation and cytotoxicity assessment of UV absorbers-intercalated zinc/aluminium-layered double hydroxides on dermal fibroblast cells, *Science of Advanced Materials*, **6**(4), 648–658 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1166/sam.2014.1752>
9. B. Saifullah, M.Z. Hussein, S.H. Hussein-Al-Ali, P. Arulselvan, S. Fakurazi, Anti-tuberculosis nanodelivery system with controlled-release properties based on paramino salicylate-zinc aluminum-layered double-hydroxide nanocomposites, *Drug Des. Devel. Ther.*, **7**, 1365–1375 (2013). Doi: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S50665>



10. F. Barahuie, M.Z. Hussein, S.H. Hussein-Al-Ali, P. Arulselvan, S. Fakurazi, Z. Zainal, Preparation and controlled-release studies of a protocatechuic acid-magnesium/aluminum layered double hydroxide nanocomposite, *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 1975–1987 (2013). Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S42718>
11. A.U. Kura, S.H.H.A. Ali, M.Z. Hussein, S. Fakurazi, P. Arulselvan, Development of a controlled-release anti-parkinsonian nanodelivery system using levodopa as the active agent, *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 1103–1110 (2013). Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S39740>
12. S.M.N. Mohsin, M.Z. Hussein, S.H. Sarijo, S. Fakurazi, P. Arulselvan, T.Y. Hin, Synthesis of (cinnamate-zinc layered hydroxide) intercalation compound for sunscreen application, *Chem. Cent. J.*, **7**(1), 26 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-26>
13. S.M.N. Mohsin, M.Z. Hussein, S.H. Sarijo, S. Fakurazi, P. Arulselvan, Y.H. Taufiq-Yap, Optimization of UV absorptivity of layered double hydroxide by intercalating organic UV-absorbent molecules, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **10**(8), 1490–1500 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1854>
14. X. Cao, W. Deng, M. Fu, *et al.*, Seventy-two-hour release formulation of the poorly soluble drug silybin based on porous silica nanoparticles: in vitro release kinetics and in vitro/in vivo correlations in beagle dogs, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **48**(1-2), 64–71 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.012>
15. R. Ghaffarian, T. Bhowmick, S. Muro, Transport of nanocarriers across gastrointestinal epithelial cells by a new transcellular route induced by targeting ICAM-1, *J. Control. Release*, **163**(1), 25–33 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.007>
16. L. Zhang, H. Xue, Z. Cao, A. Keefe, J. Wang, S. Jiang, Multifunctional and degradable zwitterionic nanogels for targeted delivery, enhanced MR imaging, reduction-sensitive drug release, and renal clearance, *Biomaterials*, **32**(20), 4604–4608 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.064>
17. D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. de Vries, *et al.*, Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls, *Nature*, **363**(6430), 605–607 (1993). Doi: <https://doi.org/10.1038/363605a0>
18. S. Iijima, T. Ichihashi, Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*, **363**(6430), 603–605 (1993). Doi: <https://doi.org/10.1038/363603a0>

19. H. Dai, Carbon nanotubes: opportunities and challenges, *Surface Science*, **500**(1–3), 218–241 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01558-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01558-8)
20. T.G. Abi, T. Karmakar, S. Taraphder, Proton affinity of polar amino acid sidechain analogues anchored to the outer wall of single walled carbon nanotubes, *Comput. Theor. Chem.*, **1010**, 53–66 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2013.02.001>
21. W. Feng, P. Ji, Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnol. Adv.*, **29**(6), 889–895 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.007>
22. Q. Chen, T. Kaneko, R. Hatakeyama, Characterization of pulse-driven gas-liquid interfacial discharge plasmas and application to synthesis of gold nanoparticle-DNA encapsulated carbon nanotubes, *Curr. Appl. Phys.*, **11**(5), S63–S66 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cap.2011.05.022>
23. Z. Mbese, B.A. Aderibigbe, Bisphosphonate-based conjugates and derivatives as potential therapeutic agents in osteoporosis, bone cancer and metastatic bone cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6869 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22136869>
24. M. Rauner, H. Taipaleenmäki, E. Tsourdi, E.M. Winter, Osteoporosis treatment with anti-sclerostin antibodies-mechanisms of action and clinical application, *J. Clin. Med.*, **10**, 787 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm10040787>
25. I. Geiger, C. Kammerlander, C. Höfer, R. Volland, J. Trinemeier, M. Henschelchen, T. Friess, FLS-CARE study group, W. Böcker, L. Sundmacher, Implementation of an integrated care programme to avoid fragility fractures of the hip in older adults in 18 Bavarian hospitals—study protocol for the cluster-randomised controlled fracture liaison service FLS-CARE, *BMC Geriatr.*, **21**, 43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12877-020-01966-1>
26. K.N. Hayes, N. He, K.A. Brown, A.M. Cheung, D.N. Juurlink, S.M. Cadarette, Over half of seniors who start oral bisphosphonate therapy are exposed for 3 or more years: Novel rolling window approach and patterns of use, *Osteoporos. Int.*, **32**, 1413–1420 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05794-2>
27. A.S. Sølling, D.H. Christensen, B. Darvalics, T. Harsløf, R.W. Thomsen, B. Langdahl, Fracture rates in patients discontinuing alendronate treatment in real life: A population-based cohort study, *Osteoporos. Int.*, **32**, 1103–1115 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05745-x>

28. J.-W. Kim, J. Yee, S.-H. Oh, S.-H. Kim, S.-J. Kim, J.-E. Chung, H.-S. Gwak, Machine learning approaches for predicting bisphosphonate-related osteonecrosis in women with osteoporosis using VEGFA gene polymorphisms, *Journal of Personalized Medicine*, **11**, 541 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/jpm11060541>
29. B.L. Langdahl, Overview of treatment approaches to osteoporosis, *Br. J. Pharmacol.*, **178**, 1891–1906 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/bph.15024>
30. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, *et al.*, Gaussian, Inc., Wallingford CT., 2009.
31. W. Koch, M.C. Holthausen, *A chemist's guide to density functional theory*, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000. pp. 3-64, 93-104.
32. A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.*, **98**(7), 5648-5652 (1993). Doi: <https://doi.org/10.1063/1.464913>
33. A.D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A*, **38**(6), 3098-3100 (1988). Doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>
34. C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B, Condens. Matter.*, **37**(2), 785-789 (1988). Doi: <https://doi.org/10.1103/physrevb.37.785>
35. P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, *J. Phys. Chem.*, **98**(45), 11623-11627 (1994). Doi: <https://doi.org/10.1021/j100096a001>
36. C.J. Cramer, D.G. Truhlar, PM3-SM3: A general parameterization for including aqueous solvation effects in the PM3 molecular orbital model, *J. Comput. Chem.*, **13**, 1089-1097 (1992). Doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.540130907>
37. D.A. Liotard, G.D. Hawkins, G.C. Lynch, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Improved methods for semiempirical solvation models, *J. Comput. Chem.*, **16**, 422-440 (1995). Doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.540160405>
38. C.C. Chambers, G.D. Hawkins, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects,

- J. Phys. Chem.*, **100**(40), 16385-16398 (1996). Doi: <https://doi.org/10.1021/jp9610776>
39. D.J. Giesen, M.Z. Gu, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, A universal organic solvation model, *J. Org. Chem.*, **61**(25), 8720-8721 (1996). Doi: <https://doi.org/10.1021/jo9617427>
40. L.J. Onsager, Electric moments of molecules in liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1486-1493 (1936). Doi: <https://doi.org/10.1021/ja01299a050>
41. J. Tomasi, Cavity and reaction field: "robust" concepts. Perspective on "Electric moments of molecules in liquids", *Theor. Chem. Acc.*, **103**, 196-199 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1007/s002149900044>
42. J. Park, V.R. Pandya, S.J. Ezekiel, A.M. Berghuis, Phosphonate and bisphosphonate inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthases: A structure-guided perspective, *Front. Chem.*, **8**, 612728 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.612728>
43. C. Marocco, G. Zimatore, E. Mocini, R. Fornari, G. Iolascon, M.C. Gallotta, V.M. Bimonte, C. Baldari, A. Lenzi, S. Migliaccio, Efficacy of denosumab therapy following treatment with bisphosphonates in women with osteoporosis: A cohort study, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**, 1728 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph18041728>
44. J. Park, V.R. Pandya, S.J. Ezekiel, A.M. Berghuis, Phosphonate and bisphosphonate inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthases: A structure-guided perspective, *Front. Chem.*, **8**, 612728 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.612728>
45. E. Adjei-Sowah, Y. Peng, J. Weeks, J.H. Jonason, K.L. de Mesy-Bentley, E. Masters, *et al.*, Development of bisphosphonate-conjugated antibiotics to overcome pharmacodynamic limitations of local therapy: Initial results with carbamate linked sitafloxacin and tedizolid, *Antibiotics*, **10**, 732 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060732>
46. S. Tanaka, Y. Tanaka, RANKL as a therapeutic target of rheumatoid arthritis, *J. Bone Miner. Metab.*, **39**(1), 106-112 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01159-1>
47. M. Vassaki, C. Kotoula, P. Turhanen, D. Choquesillo-Lazarte, K.D. Demadis, Calcium and strontium coordination polymers as controlled delivery systems of

- the anti-osteoporosis drug risedronate and the augmenting effect of solubilizers, *Appl. Sci.*, **11**, 11383 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/app112311383>
48. L. Rauch, R. Hein, T. Biedermann, K. Eyerich, F. Lauffer, Bisphosphonates for the treatment of calcinosis Cutis-A retrospective single-center study, *Biomedicines*, **9**, 1698 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111698>
  49. R.A. Fry, K.D. Kwon, S. Komarneni, J.D. Kubicki, K.T. Mueller, Solid-state NMR and computational chemistry study of mononucleotides adsorbed to alumina, *Langmuir*, **22**(22), 9281-9286 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1021/la061561s>
  50. E.M. Sarasia, S. Afsharnezhad, B. Honarparvar, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Estrogenic active stilbene derivatives as anti-cancer agents: A DFT and QSAR study, *Phys. Chem. Liq.*, **49**, 561-571 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319101003698992>
  51. B. Ghalandari, M. Monajjemi, F. Mollaamin, Theoretical investigation of carbon nanotube binding to DNA in view of drug delivery, *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **8**, 1212-1219 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1801>
  52. M. Monajjemi, N. Farahani, F. Mollaamin, Thermodynamic study of solvent effects on nanostructures: Phosphatidylserine and phosphatidylinositol membranes, *Phys. Chem. Liq.*, **50**, 161-172 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1080/0319104.2010.527842>
  53. M. Khaleghian, M. Zahmatkesh, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Investigation of solvent effects on armchair single-walled carbon nanotubes: A QM/MD study, *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*, **19**, 251-261 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/15363831003721757>

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

F. Mollaamin, M. Monajjemi, Bone therapy through drug delivery of chelated [bisphosphonate-metal ions] adsorbed on the surface of carbon nanotubes, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 741-765 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcci-quifa.v52n2.110734>

## Desarrollo de un comprimido de carbonato de litio de liberación prolongada mediante un diseño factorial

Leticia Ortega Almanza<sup>1\*</sup>, Carlos Tomás Quirino Barreda<sup>1</sup>, Lourdes Castillo Granada<sup>2</sup>, Angélica Adame Martínez<sup>1</sup>, Perla García-Guzmán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Biológicos Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, C.P. 04960 Coyoacán, Ciudad de México, México.

\*Correo electrónico: lortegaa@correo.xoc.uam.mx

<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo SN, Ejército de Oriente Zona Peñón, Iztapalapa, 09230 Ciudad de México, CDMX.

Recibido: 1 de septiembre de 2022

Revisado: 18 de marzo de 2023

Aceptado: 22 de marzo de 2023

### RESUMEN

**Introducción:** el carbonato de litio se emplea en el tratamiento del trastorno afectivo bipolar, sin embargo, requiere un control estricto de los niveles séricos debido a que es uno de los fármacos de uso psiquiátrico con un estrecho margen terapéutico. Las formulaciones de carbonato de litio de liberación prolongada tienen la ventaja de proporcionar concentraciones séricas más consistentes, que conducen a menos eventos adversos y mejor apego al tratamiento. **Objetivo:** fabricar y optimizar mediante un diseño de experimentos factorial un sistema matricial de carbonato de litio con HPMC de baja viscosidad (Methocel® E15LV), para la obtención de comprimidos que cumplan con los criterios de liberación prolongada de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). **Métodos:** se fabricaron los comprimidos mediante granulación vía húmeda y se caracterizaron mediante pruebas farmacopeicas incluyendo estudios de liberación *in vitro*. **Resultados:** mediante un diseño 2<sup>2</sup> se obtuvo una formulación final que cumplió con los requerimientos de porcentaje de fármaco liberado en los tiempos de muestreo establecido por la FEUM. Las propiedades del polímero hidrofílico seleccionado, junto con las variables estudiadas de proporción de polímero (%) y fuerza de compresión permitieron adecuar el perfil

de liberación a los niveles establecidos. **Conclusiones:** se obtuvieron matrices hidrofílicas, con una formulación simple y económica que puede ser empleada en el tratamiento con carbonato de litio mediante liberación prolongada.

**Palabras clave:** Carbonato de litio, liberación prolongada, matriz hidrofílica, diseño de experimentos, HPMC.

## SUMMARY

### Development of an extended-release lithium carbonate tablet using a factorial design

**Introduction:** Lithium carbonate is used in the treatment of bipolar affective disorder; however, it requires strict control of serum levels because it is one of the drugs for psychiatric use with a narrow therapeutic margin. Extended-release lithium carbonate formulations have the advantage of providing more consistent serum concentrations, leading to fewer adverse events and better adherence to treatment. **Aim:** To manufacture and optimize through a factorial design of experiments a lithium carbonate matrix system with a low viscosity HPMC (Methocel® E15LV), to obtain tablets that meet the extended-release criteria of the Pharmacopoeia of the United Mexican States (FEUM). **Methods:** The tablets were manufactured by wet granulation and characterized by pharmacopoeial tests including in vitro release studies. **Results:** By means of a design  $2^2$  a final formulation was obtained that met the requirement of drug released (%) in the sampling times established by the FEUM. The properties of the selected hydrophilic polymer together with the studied variables of polymer proportion (%) and compressive force allowed the release profile to be adapted to the established levels. **Conclusions:** Hydrophilic matrices were obtained, with a simple and economical formulation that can be used in the treatment with lithium carbonate by prolonged release.

**Keywords:** Lithium carbonate, extended release, hydrophilic matrix, design of experiments, HPMC.

## RESUMO

### Desenvolvimento de um comprimido de carbonato de lítio de liberação prolongada usando um planejamento fatorial

**Introdução:** o carbonato de lítio é utilizado no tratamento do transtorno afetivo bipolar, porém requer controle rigoroso dos níveis séricos por ser um dos fármacos de uso psiquiátrico com estreita margem terapêutica. As formulações de carbonato de lítio de liberação prolongada têm a vantagem de fornecer concentrações séricas mais consistentes, levando a menos eventos adversos e melhor adesão ao tratamento.

**Objetivo:** fabricar e otimizar, por meio de um planejamento fatorial de experimentos, um sistema de matriz de carbonato de lítio com HPMC de baixa viscosidade (Methocel® E15LV), para obter comprimidos que atendam aos critérios de liberação prolongada da Farmacopeia dos Estados Unidos Mexicanos (FEUM). **Métodos:** os comprimidos foram produzidos por granulação úmida e caracterizados por testes farmacopéicos, incluindo estudos de liberação *in vitro*. **Resultados:** utilizando um delineamento 2<sup>2</sup>, obteve-se uma formulação final que atendeu aos requisitos de porcentagem de fármaco liberado nos tempos de amostragem estabelecidos pela FEUM. As propriedades do polímero hidrofílico selecionado, juntamente com as variáveis estudadas de proporção de polímero (%) e força de compressão, permitiram adequar o perfil de liberação aos níveis estabelecidos. **Conclusões:** foram obtidas matrizes hidrofílicas, com formulação simples e econômica que podem ser utilizadas no tratamento com carbonato de lítio por liberação prolongada.

**Palavras-chave:** Carbonato de lítio, liberação sustentada, matriz hidrofílica, planejamento de experimentos, HPMC.

## INTRODUCCIÓN

Hace más de 50 años se encontró que el carbonato de litio (CL) era eficaz como estabilizador en el estado de ánimo para el tratamiento en la enfermedad psiquiátrica. Actualmente, las sales litio continúan siendo utilizadas en el tratamiento del trastorno afectivo bipolar. El CL induce la inhibición de la conducción nerviosa, lo que produce una respuesta de sedación y disminución del funcionamiento mental; hoy se emplea principalmente en el tratamiento a largo plazo del trastorno maníaco depresivo, y se cree que disminuye el riesgo de recurrencia de un episodio posterior. Las guías clínicas sugieren que se deben prescribir como tratamiento de mantenimiento a largo plazo, para disminuir el riesgo de recaída con un episodio de manía o depresión [1].



Sin embargo un aspecto importante en el uso de CL, es la seguridad, debido a que es uno de los fármacos de uso psiquiátricos con un estrecho margen terapéutico, por lo que requiere un control estricto de los niveles séricos (entre 0,6 y 1,4 mEq/L) [2]. Los comprimidos de CL convencionales producen un rápido y relativamente alto nivel sérico de litio que da lugar a efectos adversos. Por otro lado, los comprimidos de liberación prolongada tienen la ventaja de emplear menos dosis respecto a las tres o cuatro dosis diarias requeridas para las formas convencionales de liberación inmediata [3].

Las formulaciones de CL de liberación prolongada tienen la ventaja de proporcionar concentraciones séricas más consistentes, que conducen a menos eventos adversos y la conveniencia del régimen de dosificación con una mejor adherencia a la terapia [3, 4].

Un sistema tipo matriz, se define como aquel en el cual el principio activo sea en estado de polvo fino o de solución, se mezcla, distribuye e incorpora de manera homogénea (física o químicamente) en un polímero y esta mezcla se comprime para obtener un comprimido. Así, la incorporación de CL en matrices que contienen polímeros como Carbopol, Carboximetilcelulosa (CMC) e Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) puede proporcionar una formulación de liberación prolongada capaz de controlar la velocidad de liberación y producir un nivel plasmático deseable [4].

En los últimos años se han desarrollado comprimidos de liberación modificada, por lo que las farmacopeas han incorporado la prueba de perfil de disolución para este activo y forma farmacéutica, estableciendo las especificaciones de porcentaje de activo que debe ser liberado a distintos tiempos para asegurar la seguridad y eficacia de los tratamientos [5].

Por lo anterior, se propuso elaborar comprimidos de liberación prolongada de CL a base de una matriz hidrofílica empleando una metodología de diseño de experimentos factorial, a fin de cumplir con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel® E15LV) se obtuvo de Colorcon. Lactosa monohidratada, Carbonato de litio (CM) y Estearato de magnesio se obtuvieron de Química Lufra S.A de C.V. El Ácido clorhídrico (HCl) se obtuvo de J.T. Baker.

## Metodología

### *Diseño de experimentos*

Se planteó un diseño de experimentos factorial  $2^2$  (tabla 1) en el cual se propuso como factores de estudio la proporción de HPMC (%) y la fuerza de compresión (psi) empleada en la fabricación de los comprimidos. Cada factor se estudió en 2 niveles, con lo cual se obtuvieron 4 tratamientos o formulaciones (tabla 2), en los cuales se estudió la dureza y friabilidad como pruebas de calidad, así como el perfil de disolución para obtener una matriz conforme a las especificaciones farmacopeicas. El diseño se realizó con una réplica y posteriormente se realizó el análisis estadístico con el *software* Statgraphics Centurion XVI®.

**Tabla 1.** Matriz de diseño factorial  $2^2$

Formulación	Tratamiento	Factor A	Factor B	HPMC (%)	Fuerza de compresión (psi)
1	(1)	-	-	17	1000
2	a	+	-	26	1000
3	b	-	+	17	1500
4	ab	+	+	26	1500

**Tabla 2.** Formulaciones del diseño factorial  $2^2$

Componente	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
HPMC (%)	17	26	17	26
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (%) (CL)	42,86	42,86	42,86	42,86
Estearato de magnesio (%)	2	2	2	2
Lactosa (%)	38,14	29,14	38,14	29,14
Fuerza de compresión (psi)	1000	1000	1500	1500

### Fabricación de los comprimidos

Se fabricaron comprimidos de CL (700 mg), mediante el método de granulación por vía húmeda, de acuerdo a las formulaciones de la tabla 1. Todas las materias primas se tamizaron (malla #60) y se colocaron en un mezclador en V de acero inoxidable, mezclando durante 10 minutos a 30 rpm (Intertécnica, Modelo XV5). Se realizó la

humectación manual con agua destilada a temperatura ambiente y se tamizó el granulado húmedo (malla #24). El granulado se secó en una estufa (Napro, modelo 430) a 45 °C durante 35 minutos. El granulado seco se tamizó (malla #24) y se añadió el estearato de magnesio como lubricante. Se mezclaron durante 2 minutos a 30 rpm y la mezcla se comprimió en una prensa hidráulica (Carver) empleando un juego de punzones de acero inoxidable circulares, con cara plana de 13 mm de diámetro.

#### *Caracterización reológica*

Se realizó la caracterización reológica de los granulados obtenidos para conocer sus propiedades de flujo. Se realizaron determinaciones de densidad aparente y compactada, índice de Hausner, índice de Carr, velocidad de flujo y ángulo de reposo, empleando la metodología descrita en los métodos generales de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) [5].

#### *Densidad aparente y compactada, Índice de Carr e índice de Hausner*

Se introdujo una muestra (40 g) sin compactar en una probeta graduada (100 mL), se niveló el polvo y se midió el volumen sin asentar ( $V_0$ ). La probeta se sometió a 250 asentamientos y se midió volumen final ( $V_f$ ). Los índices de Carr y Hausner se calcularon con la información recabada de la prueba de densidad aparente y compactada.

#### *Velocidad de flujo y ángulo de reposo*

Se introdujo una muestra (50 g) en un flujómetro (Erweka, CDT), se dejó fluir libremente, se registró el tiempo, y se midió la altura y diámetro de la base del cono del lecho de polvos. Se calculó la velocidad de flujo (g/s) y el ángulo de reposo (grados).

#### *Pruebas de calidad en comprimidos*

Se realizaron determinaciones para evaluar la calidad de los comprimidos obtenidos de las diferentes formulaciones mediante la determinación de friabilidad, resistencia a la ruptura y uniformidad de contenido.

#### *Friabilidad*

Se pesó con exactitud y se determinó el peso promedio de una muestra de 10 comprimidos de cada lote (Balanza analítica Ohaus Scout Pro). La muestra se colocó en el tambor de abrasión (Friabilizador Erweka TA3R), y se hizo girar a 25 rpm durante 4 min. Finalizado el tiempo, se pesaron nuevamente y se determinó el % de friabilidad.

### *Resistencia a la ruptura (dureza)*

La prueba de dureza se realizó con 10 comprimidos de cada lote, empleando un durómetro (Durómetro Erweka, modelo TBH 220 D) con el cual se ejerció presión hasta la ruptura. Se registraron las lecturas de dureza y se calculó el valor promedio (Kp).

### *Uniformidad de dosis*

De acuerdo a la monografía especificada en la FEUM para tabletas de liberación prolongada de CL se realizó la valoración de las tabletas realizadas y se procedió a determinar la uniformidad de dosis por variación de peso.

### *Perfil de disolución*

Se realizó la prueba de disolución de los comprimidos de carbonato de litio, para las 4 formulaciones estudiadas, empleando el aparato I a  $37,0 \pm 0,5$  °C y 100 rpm (Disolutor Vankel VK-7010). El medio de disolución consistió en una solución (800 mL) de HCl 0,1N, previamente degasificada. Se tomaron alícuotas del medio de disolución a diferentes tiempos (15, 45, 90 y 120 minutos), con reposición del medio [5]. Las alícuotas se filtraron (0,35  $\mu$ m), y se analizaron con un espectrómetro de emisión de llama (Perkin-Elmer 3110) a 670,8 nm. La cuantificación de CL se realizó mediante una curva de calibración a partir de una solución Stock, en el intervalo de concentración de 2,8-14  $\mu$ g/mL. En la prueba de disolución se empleó el criterio de aceptación de la FEUM 12a edición (2018) [5] conforme a la tabla 3, donde se establecen las tolerancias permitidas, es decir la especificación de la cantidad de CL (%) disuelto en el intervalo de estudio.

**Tabla 3.** Tolerancias de cantidad disuelta de CL para comprimidos de liberación prolongada

Tiempo (h)	Cantidad disuelta (%)
15	2-16
45	25-45
90	60-85
120	No menos del 85

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Caracterización reológica**

La tabla 4 presenta los resultados de las pruebas reológicas y de contenido de humedad (%) de los granulados de las 4 formulaciones del diseño. De acuerdo al ángulo de

reposito las formulaciones F1 y F3 presentaron excelentes propiedades de flujo, mientras que las formulaciones F2 y F4 fueron buenas. En cuanto a velocidad de flujo se obtuvieron en las 4 formulaciones valores muy similares. Los granulados se mantuvieron en secado hasta alcanzar un valor de 1,0 a 2,0% de humedad. Se observó que las 4 formulaciones cumplieron con lo especificado. De acuerdo al índice de Carr las formulaciones F2 y F3 se consideran con buenas propiedades de compresibilidad, mientras que las formulaciones F1 y F4 fueron aceptables [5]. Los 4 granulados preparados presentaron propiedades reológicas adecuadas para la etapa de compresión.

**Tabla 4.** Pruebas reológicas y de contenido de humedad de los granulados

Formulación	Humedad (%)	Densidad aparente (g/mL)	Densidad compacta (g/mL)	Velocidad de flujo (g/s)	Índice de Carr	Índice de Hausner	Ángulo de reposo (°)
1	1,35±0,95	0,57±0,001	0,70±0,04	3,11±0,03	19,17±3,89	1,24±0,06	30,65±0,58
2	1,40±0,74	0,55±0,03	0,65±0,01	3,12±0,18	14,70±5,32	1,17±0,07	31,62±1,27
3	1,23±0,07	0,59±0,01	0,70±0,03	3,47±0,19	16,39±2,37	1,20±0,03	30,91±0,29
4	1,80±0,62	0,56±0,02	0,68±0,01	3,15±0,23	17,76±4,00	1,22±0,06	32,25±2,03

\*Promedio ± Desviación estándar

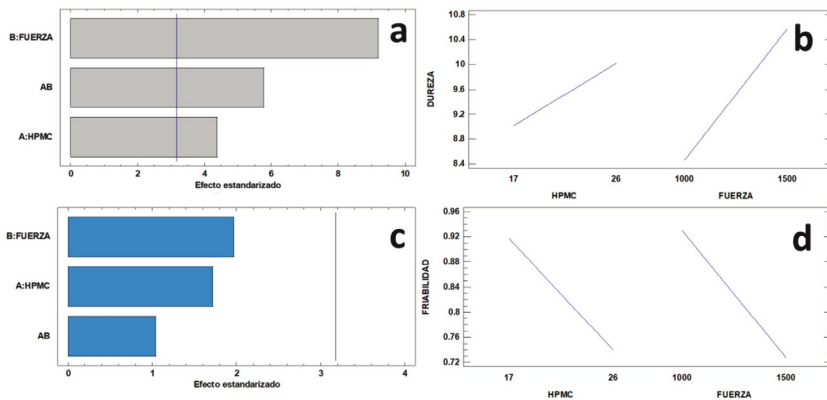
### Pruebas de calidad en comprimidos

Las formulaciones preparadas se comprimieron en una prensa hidráulica Carver y se obtuvieron comprimidos redondos de 13 mm de diámetro, de cara plana, de color blanco con superficie lisa, brillante y libre de partículas extrañas. En los comprimidos se investigó el efecto de la proporción de HPMC y fuerza de compresión en las variables de respuesta de dureza y friabilidad. En la tabla 5 se observan los resultados de dichas pruebas de calidad. En cuanto a dureza las formulaciones presentaron valores de 8,62 a 11,75 Kgf, lo cual fue adecuado conforme al intervalo deseado de 8 a 12 Kgf, mientras que para la friabilidad se encontraron % de 0,59 a 0,97 % con lo cual cumplieron con la especificación farmacopeica de friabilidad <1,0% [5]. La figura 1 presenta el diagrama de Pareto estandarizado y la gráfica de efectos principales sobre la respuesta de dureza (a y b) y friabilidad (c y d). En el caso de la dureza los dos factores de estudio, así como su interacción tuvieron un efecto significativo (valor  $p < 0,05$ ) en la respuesta, mientras que en la friabilidad no se tuvieron efectos significativos (valor  $p > 0,05$ ) en la respuesta. Se observó que tanto el HPMC, como la fuerza de compresión, tuvieron la tendencia de aumentar la respuesta de dureza, conforme se aumenta el nivel de estudio. El HPMC es un polímero que se emplea comúnmente como agente aglutinante aumentando

las fuerzas cohesivas en la matriz. Así mismo al aumentar la fuerza de compresión, se favorece la compactación de las partículas, es decir la formación de uniones interparticulares. La fuerza de compresión tuvo el mayor efecto en la dureza de las 4 formulaciones estudiadas. Este efecto favoreció la respuesta de friabilidad de las tabletas, ya que al aumentar el nivel de estudio de ambos factores disminuyó el % de pérdida de masa debido a la fricción, permitiendo obtener tabletas resistentes al desgaste.

**Tabla 5.** Control de calidad de comprimidos de carbonato de litio

Formulación	Dureza (Kgf)	Friabilidad (%)
1	8,62±1,99	0,97±0,40
2	8,30±1,66	0,90±0,29
3	9,41±1,99	0,87±0,37
4	11,75±2,45	0,59±0,08



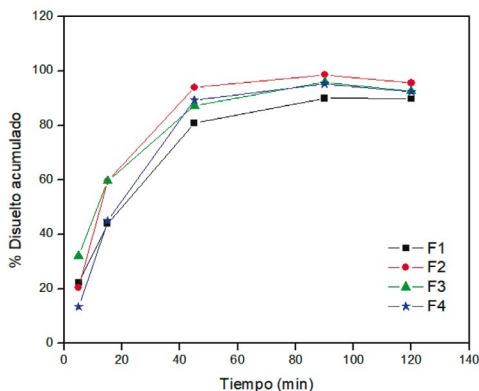
**Figura 1.** Diagrama de Pareto estandarizado y grafica de efectos principales sobre la respuesta de dureza (a y b) y friabilidad (c y d).

### Perfil de disolución

En la figura 2, se observan los perfiles de disolución de las cuatro formulaciones, en los tiempos de muestreo indicados en las tolerancias de la FEUM para comprimidos de CL. Al comparar los resultados con los criterios de aceptación farmacopéicos, se observó que los resultados sobrepasan los límites superior e inferior, lo que indica que el principio activo se está liberando más rápidamente de lo requerido por la monografía (tabla 6) [5].

A los 15 minutos el intervalo se encuentra entre 2 y 16%, sin embargo, todas las formulaciones se encontraron por arriba de la especificación de 43,95 a 59,66%. A los 45 minutos el límite esta de 25 a 45%, mientras que los valores obtenidos fueron de 80,94 a 94,04%. A los 90 minutos la especificación era de 60 a 85%, sin embargo, los valores encontrados fueron de 90,02 a 98,53. Finalmente, en el último punto de estudio fueron de 89,83 a 95,70%, los cuales cumplen con el requisito de ser no menos del 85%. El HPMC es coloide hidrofílico derivado de la celulosa con grupos hidroxipropilo y metoxilo, actualmente es uno de los polímeros más empleados en el desarrollo de formulaciones de matrices de liberación prolongada. Sin embargo, el perfil de liberación depende en gran medida de las características fisicoquímicas del tipo de HPMC, como peso molecular, viscosidad, grado de sustitución, etc. Ya se ha reportado que las características críticas del polímero en un sistema matricial son la viscosidad y la solubilidad del polímero o capacidad de hinchamiento [6]. En este trabajo se empleó HPMC Methocel® E15LV el cual es un polímero de baja viscosidad (12-18 cp) y bajo peso molecular, ya que el tiempo requerido para que se lleve a cabo la liberación es de 120 min. El HPMC Methocel® E15LV presento resultados similares a otros estudios donde emplean HPMC de baja viscosidad (HPMCK100LV) en el cual se llevó a cabo la liberación en un tiempo total de 2 horas empleando proporciones de 20% del polímero en la formulación, mientras que al aumentar la proporción al 30% del polímero, el tiempo de la liberación puede aumentar hasta 4 horas [7].

El perfil de disolución también se puede ver influenciado por la dureza de las tabletas, ya que al aplicar menor fuerza de compresión, se obtienen comprimidos menos compactos y con mayor grado de porosidad, lo cual favorece la entrada de agua en la matriz y la rápida disolución del fármaco [7].



**Figura 2.** Gráfica de perfiles de disolución de las formulaciones de diseño 2<sup>2</sup>

**Tabla 6.** Control de calidad de comprimidos de carbonato de litio

Tiempo (min)	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
5	22,33±13,54	20,38±9,60	32,14±19,95	13,42±4,51
15	43,95±11,43	59,66±23,54	59,62±28,00	45,03±16,12
45	80,94±1,65	94,04±5,56	87,24±10,91	89,34±0,78
90	90,02±13,85	98,53±0,97	95,92±5,58	95,28±9,64
120	89,83±11,81	95,70±0,63	92,70±2,72	92,42±9,58

\*Promedio ± Desviación estándar

### Optimización de la formulación

Se investigó las condiciones de HPMC y fuerza de compresión mediante una gráfica de superficie de respuesta (figura 3), a fin de optimizar la formulación que permita una liberación más lenta del principio activo. En la superficie de respuesta se puede observar que, de acuerdo a las tendencias de los efectos principales, es necesario aumentar tanto la proporción de HPMC como la fuerza de compresión durante la fabricación. En la figura 4 se muestra el gráfico de contornos de la superficie de respuesta estimada que proporciona la predicción realizada a partir de los datos experimentales de las formulaciones 1 a 4. Se determinó la fuerza de compresión y la cantidad de HPMC a utilizar para obtener una respuesta de porcentaje de CL disuelto que pudiera cumplir los criterios de aceptación farmacopéicos. Para la formulación optimizada se seleccionó un % de HPMC de 31,0 y fuerza de compresión de 1800 psi (figura 4).

Se fabricó la formulación optimizada siguiendo la misma metodología de fabricación y se realizó su caracterización reológica. El granulado de la formulación optimizada se mantuvo en una humedad de  $2,41 \pm 0,24$  %, lo cual le permitió tener buenas propiedades de flujo, ya que presenta una velocidad de flujo de  $2,48 \pm 0,01$  (g/s) con un ángulo de reposo de  $30,65 \pm 0,58$ , que corresponde a bueno. Además, presentó índice de Hausner y Carr de  $1,26 \pm 0,01$  y  $20,42 \pm 0,59$  respectivamente, lo que indica que tiene buenas propiedades de compresibilidad. Posteriormente se comprimieron las tabletas bajo las mismas condiciones previas y se obtuvieron tabletas con dureza de  $10,13 \pm 1,25$  y  $0,39 \pm 0,05$  % de friabilidad, lo cual cumple con las especificaciones [5].

### Uniformidad de contenido

La formulación optimizada se analizó mediante la valoración y uniformidad de contenido. Se observó que las tabletas presentaron una cantidad promedio de  $104,50 \pm 1,41$  % con lo cual cumplen con la especificación farmacopéica de 90-110%.



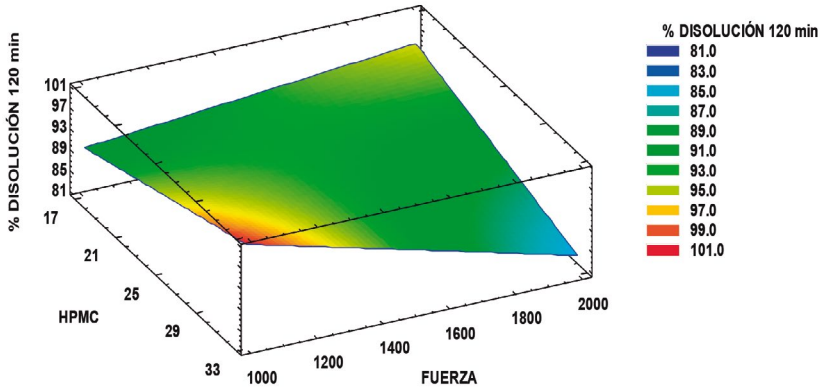


Figura 3. Gráfica de superficie de respuesta estimada para % de disolución a los 120 min.

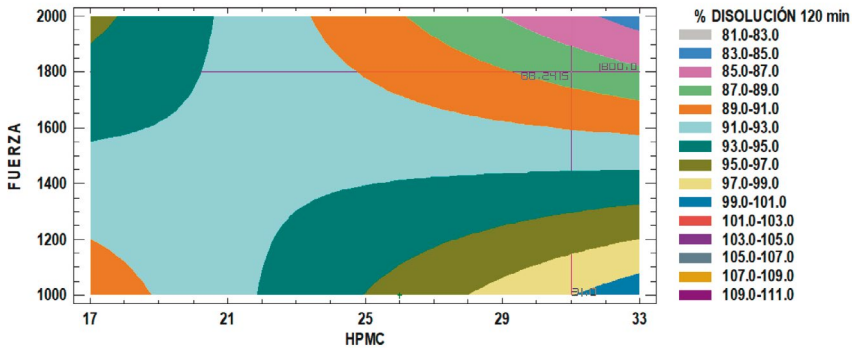


Figura 4. Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada para % de disolución a los 120 min.

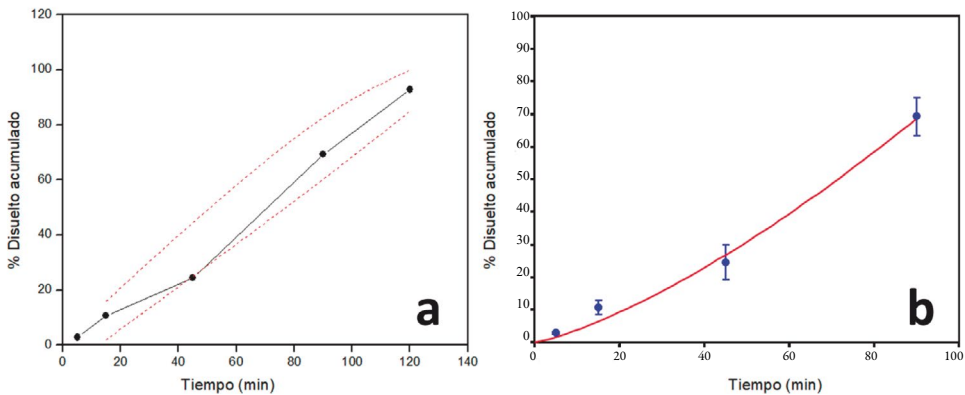
### Perfiles de disolución de fórmula optimizada

La figura 5a presenta el perfil de disolución de la formulación optimizada de CL. Se observó que la formulación final cumplió con los límites establecidos por la FEUM para comprimidos de CL de liberación prolongada. Al aumentar la proporción de HPMC (%) y fuerza de compresión de acuerdo a las curvas de predicción, se logró tener una liberación más lenta desde los primeros tiempos del estudio, permitiendo cumplir con la especificación de los 120 minutos. Se ha reportado que al aumentar el contenido de HPMC se aumenta la capacidad de hinchamiento de las matrices y se reduce su índice de erosión lo cual favorece la liberación más lenta [8], debido a que hay un incremento en el espesor de la capa gel y su viscosidad [7]. Posteriormente se realizó

el ajuste del ~60% del perfil de liberación al modelo de Korsmeyer-Peppas (ecuación 1) el cual permite caracterizar diferentes mecanismos de liberación, mediante el valor de  $n$ . Valores de  $n=0,5$  corresponde a liberación mediante difusión de Fick,  $0,5 \leq n \leq 1,0$  corresponden a un transporte no Fickiano (anómalo),  $n=1,0$  corresponde al transporte Caso II y  $n > 1,0$  refiere a un transporte Super caso II [9]. La matriz preparada presento un buen ajuste al modelo con un coeficiente de correlación de  $R^2=0,9854$  y un valor de  $n$  de  $1,364 \pm 0,277$  (figura 5b), que corresponde a transporte Super Caso II. El transporte tipo caso II y super caso II es característico de los sistemas matriciales poliméricos ya que implica relajamiento de las cadenas, hinchamiento y erosión de la matriz [6, 10].

Otros estudios han reportado la preparación de matrices hidrofílicas de CL para liberación prolongada durante 24 horas, empleando combinaciones de diferentes polímeros como HPMC y Eudragit S100 [4]. También, se han reportado comprimidos de CL tipo bomba osmótica para liberación durante 24 horas [11]. Sin embargo las presentaciones actuales de liberación prolongada se adecuan al tiempo de 120 min, debido a que por si mismo el CL tiene un tiempo de vida largo, alrededor de 20-24 horas [4].

Korsmeyer-Peppas 
$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{(Ecuación 1)}$$



**Figura 5.** Gráfica de perfil de disolución de las formulación optimizada (a), Ajuste del ~60% de la liberación al modelo de Korsmeyer-Peppas.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener una formulación de comprimidos a base de HPMC Methocel® E15LV para liberación prolongada de CL, que cumple con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Mediante la optimización de un diseño factorial se obtuvo las condiciones adecuadas para emplear un polímero de baja viscosidad para controlar la liberación de CL durante 120 min. La formulación obtenida es un producto que puede cumplir con los requerimientos regulatorios de la prueba de disolución y pruebas de calidad, mediante una formulación sencilla y económica.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

## REFERENCIAS

1. J. Moncrieff, El litio y otros fármacos usados para el trastorno maniaco-depresivo, *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*, **38**(133), 283-299 (2018). Doi: <https://doi.org/10.4321/s0211-57352018000100015>
2. M.E. Machado-Duque, C. Alzate-Carvajal, K. Zapata-Castañeda, J.E. Machado-Alba, Perfil de utilización del carbonato de litio en pacientes con trastorno afectivo bipolar en 25 ciudades de Colombia, *Biomédica*, **37**, 43-50 (2017). Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2815>
3. P. Girardi, R. Brugnoli, G. Manfredi, G. Sani, Lithium in bipolar disorder: Optimizing therapy using prolonged-release formulations, *Drugs in R & D*, **16**(4), 293-302 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1007/s40268-016-0139-7>
4. S.A. Shinde, P.S. Kadam, M.M. Biradar, G.S. Tolsarwad, Formulation and evaluation of sustained release matrix tablet of lithium carbonate using hydroxypropyl methylcellulose, *Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy*, **8**(3), 83-88 (2020). Doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-a.3406>
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 12a ed., Secretaría de Salud, México D.F., 2018.
6. D. Košir, T. Ojsteršek, S. Baumgartner, F. Vrečer, A study of critical functionality-related characteristics of HPMC for sustained-release tablets, *Pharmaceuti-*

- cal Development and Technology*, **23**(9), 865-873 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1264417>
7. P.S. Hiremath, R.N. Saha, Controlled release hydrophilic matrix tablet formulations of isoniazid: Design and *in vitro* studies, *AAPS PharmSciTech*, **9**(4), 1171-1178 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9159-0>
  8. T. Qazi, Formulation development and evaluation of Diltiazem HCl sustained release matrix tablets using HPMC, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **26**(4), 653-663 (2013).
  9. M.L. Bruschi (editor), Mathematical models of drug release, en: *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*, Woodhead Publishing, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
  10. O. Almanza, Q. Barreda, C. Tomás, N. Méndez, S. García, Efecto de la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en la liberación de un fármaco iónico, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **47**(1), 55-61 (2016).
  11. V. Patel, A. Chudasama, M. Nivsarkar, K. Vasu, C. Shishoo, Push-pull osmotic pump for zero order delivery of lithium carbonate : Development and *in vitro* characterization, *Pharmaceutical Development and Technology*, **17**(3), 375-382 (2012). Doi: <https://doi.org/10.3109/10837450.2010.542577>

## CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L. Ortega-Almanza, C.T. Quirino-Barreda, L. Castillo-Granada, A. Adame-Martínez, P. García-Guzmán, Desarrollo de un comprimido de carbonato de litio de liberación prolongada mediante un diseño factorial, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(2), 766-780 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.104560>

## Clinical evolution of acute bronchitis in Colombian children between 2 and 14 years treated with *Hedera helix* EA575 syrup

Danitza Madero Oróstegui<sup>1</sup>, Guillermo Sánchez-Vanegas<sup>2\*</sup>, Fernando Vera Castro<sup>3</sup>, Andrés Bastidas Manzanares<sup>4</sup>, Angélica Monterrosa-Blanco<sup>5</sup>, Gloria Esperanza Castro<sup>6a</sup>, Alvaro Guillermo Vallejos Narvaez<sup>6b</sup>

<sup>1</sup>Hospital Santa Clara, Cra. 14b #1-45 sur, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup>Hospital Universitario Mayor Mederi (Universidad del Rosario), Cl. 24 #29-45, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>3</sup>Universidad del Quindío, Manizales, Colombia.

<sup>4</sup>Clínica Imbanaco, Quiron Salud, Cra. 38 Bis #5B2-04, Cali, Colombia.

<sup>5</sup>SIIES Consultores SAS, Cl. 106 #54-15, Of. 602, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>6</sup>Megalabs Colombia SAS, Cl. 106 #18A-45, Bogotá D.C., Colombia.

Correos electrónicos:

<sup>1</sup>danymadero1@gmail.com, <sup>2</sup>guillermosanchezvanegas@gmail.com, <sup>4</sup>doctor.bastidas@gmail.com,

<sup>5</sup>ammonterrosa@fucsalud.edu.co, <sup>6a</sup>gcastro@megalabs.com.co, <sup>6b</sup>avallejos@megalabs.com.co

\*Corresponding author

Received: December 22, 2022

Corrected: March 23, 2023

Accepted: March 30, 2023

### SUMMARY

**Aim:** To describe the experience of use and clinical evolution of patients with acute bronchitis treated with *Hedera helix* EA575 syrup for seven days. **Methods:** A descriptive observational study based on clinical records, which included patients between 2-14 years old with acute bronchitis prescribed by their doctor *Hedera helix* EA575 syrup. Sociodemographic data and the time of evolution of the cough were taken from the baseline consultation. Treatment-related variables, BSS-Pediatric Scale, visual analogue cough scale, and verbal descriptive cough score were taken from the follow-up. The satisfaction with the treatment and its success were evaluated after 14 days. **Results:** 80 patients between 2 and 12 years old were included. The median number of cough days was eight days. After 7 and 14 days of treatment, 50% and 76% had resolved the cough, respectively. On day 14, coughing

was frequent without interfering with activities in 1 patient. The BSS-pediatric score decreased at each follow-up. Median day-and-night cough VAS was zero for day 14. Awakenings due to coughing decreased from 3 at baseline to 0 per week. 98.75% of the patients were satisfied with the treatment, and none presented adverse events. **Conclusions:** After seven days of treatment, half of the patients had resolved cough and night awakenings; it is suggested that treatment with *Hedera helix* EA575 could be beneficial and of low risk.

**Keywords:** Bronchitis, cough, hedera, phytotherapy, child.

## RESUMEN

### Evolución clínica de la bronquitis aguda en niños colombianos entre 2 y 14 años tratados con jarabe *Hedera helix* EA575

**Objetivos:** describir la experiencia de uso y la evolución clínica de pacientes con bronquitis aguda tratados con *Hedera helix* EA575 jarabe durante 7 días. **Métodos:** estudio observacional descriptivo basado en registros clínicos, incluyó pacientes entre 2-14 años con bronquitis aguda a quienes su médico les prescribió *Hedera helix* EA575 jarabe. De la consulta basal se tomaron datos sociodemográficos y el tiempo de evolución de la tos. De los seguimientos se tomaron variables relacionadas con el tratamiento, la escala BSS-pediátrica, escala visual análoga de la tos y el puntaje de categoría verbal descriptiva de la tos. A los 14 días de evaluó la satisfacción con el tratamiento y el éxito del mismo. **Resultados:** se incluyeron 80 pacientes entre 2 y 12 años. La mediana de días de tos fue 8 días, después de 7 y 14 días de tratamiento el 50% y 76% había resuelto la tos, respectivamente. Al día 14 la tos era frecuente en 1 paciente, esta no interfería con sus las actividades. El puntaje del BSS-pediátrico disminuyó en cada seguimiento. La mediana de la EVA de tos día y noche fue cero para el día 14. Los despertares por tos pasaron de 3 en el momento basal a 0 a la semana. El 98,75% de los pacientes estuvieron satisfechos con el tratamiento y ninguno presentó eventos adversos. **Conclusiones:** al completar los 7 días de tratamiento, la mitad de los pacientes había resuelto la tos y los despertares nocturnos, se sugiere que el tratamiento con *Hedera helix* EA575 podría ser beneficioso y de bajo riesgo.

**Palabras clave:** Bronquitis, tos, hedera, fitoterapia, niños.

## RESUMO

### Evolução clínica da bronquite aguda em crianças colombianas entre 2 e 14 anos tratadas com xarope *Hedera helix* EA575

**Objetivo:** descrever a experiência de uso e a evolução clínica de pacientes com bronquite aguda tratados com *Hedera helix* EA575 xarope por 7 dias. **Métodos:** estudo observacional descritivo baseado em registros clínicos, incluiu pacientes entre 2-14 anos de idade com bronquite aguda que receberam prescrição de *Hedera helix* EA575 xarope por seu médico. Os dados sociodemográficos e a duração da evolução da tosse foram retirados da consulta inicial. Variáveis relacionadas ao tratamento, a escala BSS-pediátrica, a escala visual analógica de tosse e o escore descritivo de categoria verbal da tosse foram retirados dos acompanhamentos. Após 14 dias, foi avaliada a satisfação com o tratamento e seu sucesso. **Resultados:** foram incluídos 80 pacientes entre 2 e 12 anos. O número médio de dias de tosse foi de 8 dias, após 7 e 14 dias de tratamento 50% e 76% haviam resolvido a tosse, respectivamente. No 14º dia, a tosse foi frequente em 1 paciente sem interferir nas atividades. A pontuação pediátrica da BSS diminuiu a cada acompanhamento. A EVA mediana para tosse diurna e noturna foi zero no dia 14. Os despertares devido à tosse aumentaram de 3 no início do estudo para 0 por semana. 98,75% dos pacientes ficaram satisfeitos com o tratamento e nenhum apresentou eventos adversos. **Conclusões:** ao completar os 7 dias de tratamento, metade dos pacientes havia resolvido a tosse e os despertares noturnos, sugerindo que o tratamento com *Hedera helix* EA575 pode ser benéfico e de baixo risco.

*Palavras-chave:* Bronquite, tosse, hedera, fitoterapia, crianças.

## INTRODUCTION

Infections of the respiratory system are considered a prevalent public health problem and are one of the most frequent reasons for consultation in the pediatric population [1]. Among the most common is acute bronchitis, caused by inflammation of the lining of the bronchi that tends to be recurrent and self-limiting for up to three weeks, surpassing the five days of expected symptoms in the common cold and making it possible to differentiate the diagnosis of bronchitis. The main symptom is cough, associated with odynophagia, nasal discharge, and sometimes fever [2]. It is estimated that annually, 5% of the general population reports an episode of acute bronchitis, of which 90% go to a health professional [2].

External, environmental, age and family-inherited factors are related to increased cases of acute bronchitis. These occur more frequently in winter than in summer, as climate changes between indoor and outdoor spaces and rainfall increase mucosal vulnerability to pathogens. Likewise, air pollution, exposure to smoke, poor access to public services, inadequate hand washing, and a family history of bronchial asthma and allergies increase the incidence of acute bronchitis [3, 4].

Specifically, in children, this bronchial inflammation generates an important repercussion on the quality of life. When coughing is frequent and intense, it may affect daily activities, interfere with sleep, modify the family dynamics, generate school absenteeism in children and work in parents, produce mood changes, and increase the direct and indirect costs related to bronchial pathology [1]. Therefore, a symptomatic therapeutic intervention must prioritize its effect on controlling the cough's intensity, frequency, and duration.

In 90% of cases, acute bronchitis occurs due to viral etiology, most commonly involving respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza A and B, parainfluenza, coronavirus, and rhinovirus [3, 5]. Even so, 8 out of 10 patients are treated with antibiotic therapy, constituting an inappropriate and ineffective therapy, which increases antimicrobial resistance and the appearance of adverse events, making management symptomatic [2, 6, 7]. Phytopharmaceuticals and alternative medicine have been used for over 50 years and have demonstrated clinical effectiveness and acceptability by patients, mainly due to their natural components [8]. In addition, in Europe, using the dry extract of ivy leaves EA575 for treating acute bronchitis is common, and more than 65,000 patients in 20 studies have demonstrated its effectiveness [9-13].

*Hedera helix* EA575 syrup, obtained from ivy EA575 leaves, is available. This syrup is a mucolytic, expectorant, and bronchodilator and works as an anti-inflammatory at the level of the lungs and airways [8, 11, 14-18]. The above is why it has been indicated for the symptomatic management of adult and pediatric patients with acute bronchitis and has INVIMA registration. Latin American literature demonstrates its effectiveness and safety; however, no local research was found [13]. This study was conducted to document the syrup's user experience in a real-life scenario in Colombia and to describe the clinical evolution of a cohort of patients aged 2 to 14 years with a diagnosis of acute bronchitis treated with *Hedera Helix* EA575 syrup for seven days.



## METHODOLOGY

**Design:** A retrospective descriptive observational study based on the clinical records of a cohort of patients diagnosed with acute bronchitis who were prescribed *Hedera helix* EA575 syrup as part of their treatment.

**Population and sampling:** Using sequential convenience sampling, we included all available clinical records (N=80) of patients between 2 and 14 years with a clinical diagnosis of acute bronchitis with dry or productive cough, with or without bronchospasm, who had symptoms for at least three days, who were or were not using concomitant pharmacological management with antibiotics, antihistamines or inhaled B2 agonists, and who had been prescribed *Hedera helix* EA575 syrup by their treating physician. We excluded records of patients who (or whose legal representative) did not authorize the use of their data. In addition, we excluded patients with a confirmed diagnosis of COVID-19, those under corticosteroid, antitussive, or mucolytic management, and those with other diseases such as allergic asthma or bronchial hyperre-activity, chronic bronchitis, chronic or inherited lung diseases, or severe heart, liver, or kidney disorders.

**Procedure:** From the private consultation of three pediatricians in Bogotá, Cali, and Cúcuta, we identified patients who had a prescription for *Hedera helix* EA575 syrup as part of the treatment for acute bronchitis and who met the selection criteria. From the selected patients' clinical history records, we obtained the evolution of the clinical parameters of interest, previously filled out by the treating physician during an initial consultation and in the follow-ups at seven days (or – 2 days) and at 14 days (or – 2 days) of having started the use of *Hedera helix* EA575 syrup. This information was later documented in an information collection application designed for research.

**Variables of interest:** The variables identified in the patient's clinical history at baseline were sociodemographic variables such as age and sex and the time of evolution of the cough in days. The need for concomitant antibiotic treatment, the presence of adverse events, the discontinuation of treatment, and the following scales related to the patient's condition, were identified at baseline and follow-ups 7 and 14 days after the start of treatment. The presence of cough, pulmonary rales, and dyspnea was evaluated with the BSS-pediatric scale, which rates each item from 0 to 4 (0-absent, 1-mild, 2-moderate, 3-severe, 4-very severe). Then, these scores are added together, resulting in a total score between 0 and 12. The cough evaluation was conducted by quantifying the number of times the child woke up the night before due to cough, and with the Visual Analogue Scale (VAS) of cough during the day and night, measured in millimeters, which ranges between 0 and 100, where 0 indicates no cough and 100 mm the

worst possible cough in the last 24 hours. The cough impact was determined with the Verbal Cough Descriptive Category Score (VCD), where 0 = no cough, 1 = cough for one or two short periods, 2 = cough for more than two short periods, 3 = cough that is frequent but doesn't interfere with the patient's activities, 4 = frequent cough that interferes with the patient's activities, and 5 = the patient is unable to perform most activities.

Additionally, satisfaction with the treatment was measured during the last follow-up appointment. This satisfaction was determined with the *Integrative Medicine Patient Satisfaction Scale* (IMPSS), in which 1 = very satisfied, 2 = satisfied, 3 = neutral, 4 = dissatisfied, and 5 = very dissatisfied. The degree of success or failure of the treatment was also established with the scale *Integrative Medicine Outcomes Scale* (IMOS) from the perspective of the doctor and the patient, where 1 = complete recovery, 2 = important improvement, 3 = slight to moderate improvement, 4 = no change, and 5 = deterioration.

**Analysis:** The variables were analyzed according to their nature; the quantitative variables were described using measures of central tendency and dispersion according to the symmetry of the data distribution. For qualitative variables, frequency tables with absolute and relative values were used. For the three components of the BSS-pediatric scale (cough, rales, dyspnea) and the VCD scale, the absolute number and percentage of subjects in each category were established for each of the three measurement times. Likewise, the IMPSS and IMOS scales were thoroughly analyzed according to the information from the last follow-up appointment (Day 14). For the overall scale score BSS-pediatric and the VAS score, central tendency statistics and dispersion were calculated at baseline, seven days, and 14 days, as presented in summary tables.

**Ethics:** For the development of this research, national and international guidelines were followed, including the Helsinki Declaration and the Belmont Report. Per the regulations issued by the Colombian Ministry of Health (Resolution 08430), this study was classified as risk-free research. Its execution had the approval of an independent ethics committee (CEISH - Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos. Sociedad de Cirugía de Bogotá, Hospital de San José).

## RESULTS

The study included eighty patients, between 2 and 12 years old, 37.5% were girls (n=30) and 62.5% boys (n=50). The median number of cough days was 8, with 50% of patients between 6 and 12 days. No adverse events were reported during therapy in any of the participants. In one patient, suspension of treatment was reported on day seven

due to complete improvement. At admission, 23.8% had concomitant management with antibiotics (n=19). On day 7 of follow-up, this management was described in 11 patients (13.75%) and at 14 days in only two patients (2.5%). Tables 1 and 2 show the details of all the qualitative and quantitative measurements.

**Table 1.** BSS (cough, dyspnea, and rales) and VCD

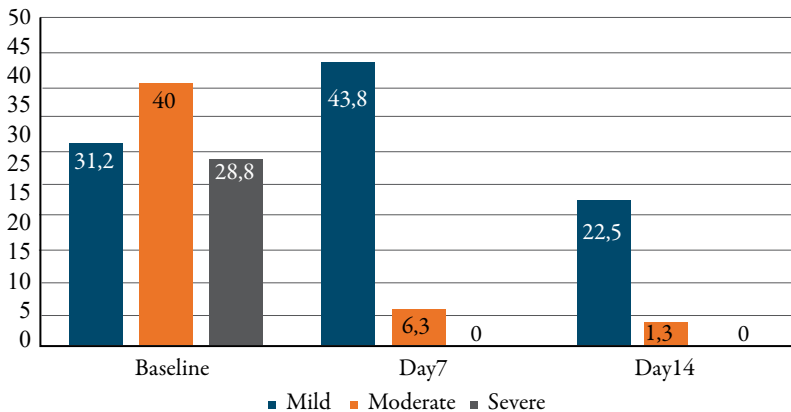
SYMPTOM AND SEVERITY	BASAL	7 DAYS	14 DAYS
	N (%)		
<b>BSS: Cough</b>			
Absent	0	40 (50)	61 (76.25)
Light	25 (31.3)	35 (43.8)	18 (22.5)
Moderate	32 (40.0)	5 (6.3)	1 (1.3)
Severe	23 (28.8)	0	0
<b>BSS: Dyspnea:</b>			
Absent	60 (75)	78 (97.5)	80 (100)
Light	19 (23.8)	2 (2.5)	0
Moderate	1 (1.3)	0	0
Severe	0	0	0
<b>BSS: Rales:</b>			
Absent	46 (57.5)	76 (95)	79 (98.75)
Light	30 (37.5)	4 (5.0)	1 (1.25)
Moderate	4 (5.0)	0	0
Severe	0	0	0
<b>VCD</b>			
No cough	0	40 (50.0)	61 (76.3)
1 or 2 short coughing periods	33 (41.3)	11 (13.8)	7 (8.8)
More than two short periods of coughing	4 (5.0)	24 (30.0)	11 (13.8)
Frequent cough but does not interfere	29 (36.3)	5 (6.3)	1 (1.3)
Frequent cough interferes	14 (17.5)	0	0
Unable to perform activities	0	0	0

**Table 2.** Global BSS score, cough VAS (day and night), and episodes of nocturnal awakening.

SCALE OR SYMPTOM	BASAL	7 DAYS	14 DAYS
	MEDIAN (IQR)		
Pediatric BSS (0 to 12)	3 (2- 3)	1 (0- 1)	0 (0- 0.5)
Pediatric BSS (concomitant AB)	3 (2- 3)	1 (0- 1)	0 (0-0)
Pediatric BSS (Without concomitant AB)	3 (2- 3)	1 (0- 1)	0 (0- 1)
VAS day cough (0 to 100)	70 (60- 80)	20 (10- 27.5)	0 (0- 2)
VAS night cough (0 to 100)	70 (50- 80)	10 (5.5- 20)	0 (0-0)
Awakening from cough	3 (2- 4)	0 (0- 1)	0 (0-0)

**Evolution of the Pediatric BSS with its three components**

*Cough:* At the time of the baseline measurement, 100% of the patients had a cough; 25 classified it as mild, 32 moderate and, 23 severe. After seven days of treatment, 35 patients reported mild cough, 5 reported moderate cough, and the cough in 40 (50%) patients had disappeared. After 14 days of follow-up, in 61 patients (76.2%), the cough was controlled entirely; in 18 cases, it was mild, and only in one case it was reported as moderate (Figure 1)



**Figure 1.** Evolution of the pediatric BSS. Cough component

*Dyspnea:* At the start of treatment, 20 patients reported symptoms of dyspnea (25%), classified as mild by 19 of them (23.7%) and, in one case, as moderate (1.25%).

On day 7, this symptom was present in two patients (2.5%); on day 14, no patient reported dyspnea.

*Rales:* According to the medical examination, at baseline, 30 patients had mild rales (37.5%), and four had moderate rales (5%); on the seventh day, four patients had rales (5%), and on day 14 they were present in 1 patient (1.2%).

*Overall score:* At admission, the median of the Pediatric BSS was 3 points (IQR: 2-3), moving to a point on day seven (IQR: 0-1) and zero points on day 14 (0-0.5). The baseline and follow-up pediatric BSS medians were the same in the group that received concomitant antibiotics and those that did not (see Table 2).

### **Evolution of cough**

As reported in the VAS of cough during the day and at night in the initial measurement, the median was 70 points with IQR: 60-80 and IQR: 50-80, respectively; going to 20 points for the day VAS, and 10 points for the night VAS on day 7, and reaching a median of zero at 14 days, both the day and night EVA.

Regarding the number of times the children woke up due to cough, the initial median was three occasions, reaching zero at seven days and zero at 14 days.

Using the VCD scale as a reference, at baseline, 43 patients (53.8%) reported episodes of frequent coughing, including 14 patients in whom the cough interfered with daily activities (17.5%). After seven days of treatment, in five patients, the cough was frequent (6.3%), and in no case did it interfere with activities. On day 14 of follow-up, the cough was frequent in one patient (1.3%) and did not interfere with activities.

### **Overall satisfaction level with treatment - IMPSS**

After 14 days, 67.5% of the patients considered themselves very satisfied (n=54), and 31.25% reported being satisfied (n=25). In summary, 98.75% (n=79) reported satisfaction with the treatment. Only one patient reported neutral satisfaction. In no case was dissatisfaction reported.

### **Treatment success – IMOS**

After 14 days, patient-reported treatment success was complete recovery in 55 patients (68.7%), major improvement in 23 patients (28.75%), and mild to moderate improvement in two patients (2.5%). From the physician's perspective, the treatment success report was complete recovery in 55 patients (68.7%) and significant improvement in 25 patients (31.25%). No change or deterioration in health status was reported in any case.

## DISCUSSION

Eighty children with acute bronchitis received symptomatic management with the extract of *Hedera helix* EA575, an over-the-counter phytopharmaceutical in Colombia, for seven days and were monitored for seven more days. The presence of cough was 100% in the initial measurement; after seven days, it disappeared in 50% of the participant, and at 14 days, 76.2% of the patients were free of cough. According to the VDC, in 14 days, the cough went from being frequent in 43 patients to only one. There was also a decrease in this impact: from day 7 of treatment, no patient reported interference in daily activities due to cough. The median of the pediatric-BSS was three, one, and zero at each of the three measurement times. After seven days of follow-up, a reduction in the median cough VAS of 50 and 60 points during both day and night was documented. By day 14, the median for both scales was zero. The median awakenings from cough increased from 3 at baseline to 0 at 7 and 14 days. Due to clinical improvement, 98.75% of patients reported being satisfied with the treatment. The patients and the doctors agreed that 68.7% of the patients achieved complete recovery with management with *Hedera helix* EA575 syrup. None of the patients presented adverse events during the use of the treatment.

Phytotherapy refers to using plant substances, parts of plants, or products thereof after being subjected to different treatments to obtain their properties for therapeutic purposes. Currently, there are two types of phytopharmaceuticals, ancestral and medicines; the latter have standardized extraction and purification processes, ensuring that this characterization is maintained and are those that have demonstrated effectiveness [19]. The extract from *Hedera Helix* EA575 is a product with complex structures that are difficult to copy because it is a phytomedicine. The available evidence on efficacy and safety comes from using *Hedera Helix* EA575 specifically; to the best of our knowledge, no other product with *Hedera helix* has shown phytosimilarity [9,11,12,16]. Therefore, the abundant and overwhelming evidence favoring *Hedera Helix* EA575 cannot be extrapolated to other substances with different components.

A multicenter clinical trial in 11 Latin American countries determined the efficacy [13], tolerance, and safety of the syrup with extract of *H.helix* EA575 in patients with bronchitis administered for seven days. It included 9,657 patients, 5,181 of whom were children. The mean duration of symptoms was four days, improvement or disappearance of cough and expectoration occurred in 93%, tolerance to the syrup was described as good or very good by 96.6%, and 2.1% of the participants presented an adverse event predominantly of gastrointestinal origin. In contrast, in the present study, the median number of cough days was eight, and no adverse events occurred. Additionally, it is

important to highlight that in the Latin American study by Fazio *et al.*, has was shown that the concomitant use of antibiotics or other medications did not show a benefit in terms of efficacy but instead increased the risk of adverse events. In our study, the outcomes of interest were also the same for those who used concomitant treatments compared to those who did not.

Schaefer *et al.*, in two randomized clinical trials conducted in 2016 [9] and 2019 [10] in German adult patients, reiterates the effectiveness of EA575 ivy leaf extract compared to placebo. As in the present study, through the application of the Bronchitis Severity Score (BSS), the VAS of cough, and the VCD scale, a significant reduction in their scores was identified in the intervention group compared to the control group. Based on the BSS and VCD scores, the statistical superiority of the *H. helix* EA575 against placebo was obtained on the second and the third day of treatment, respectively. Additionally, this effect was maintained until the end of the observation period, established at 14 days, suggesting a symptomatic effect even one week after the end of treatment.

In the pediatric population, rales, and dyspnea tend to be infrequent, which could explain the low scores in these two components of the BSS-pediatric and the global score obtained in the present study. Greater relevance should be given to the clinical evaluation of cough, considered the most important symptom of acute bronchitis and, consequently, the outcome in which the most significant impact is expected. According to the cough component score of the pediatric BSS, the cough VAS and the VCD found in this study, *H. helix* EA575 syrup stands out for its symptomatic relief capacity, improving the intensity, frequency, and duration of cough, as well as the commitment of daily activities.

It is also important to note that the results of this study agree with the results found by Lang *et al.* [11]. Their study observed a cohort of 1,066 schoolchildren aged 6 to 12 years with a diagnosis of acute bronchitis who received management with ivy leaf extract EA575 for seven days and evaluated its effectiveness according to the BSS clinical score. This study recorded an improvement in 79.3% of patients regardless of using additional concomitant therapy or variable administration of the product. Regarding the assessment made by the patients and their parents, the study showed an improvement in the symptoms caused by bronchitis by up to 58.1%. The incidence of daily coughing fits decreased considerably, from 15-20 per day to around 5 per day. Night-time awakenings were also less frequent at the end of treatment, reducing from 7 times per night to approximately two per night.

The clinical effectiveness of ivy Leaf extract can be explained by its well-studied effects at the pulmonary and bronchial levels. Oleanolic saponins, represented by heder-

agenin,  $\alpha$ -hederin, and hederacoside C, are the main components of the extract of *H. helix*, which according to research, could have an indirect mimetic  $\beta_2$  effect. This effect allows for bronchodilator activity, increased production of pulmonary surfactant, maintenance of alveolar function, antitussive effect, and ease of expectoration of bronchial secretions, leading to a resolution of the clinical picture and prolonging its effects even up to a week after the end of the treatment, as has been found in different studies and this study [8, 14, 20].

The results showed a significant reduction in the presence, frequency, impact, and repercussions of the main symptom of acute bronchitis in the pediatric age, which translates into clinical improvement, quality of life, normal development of daily activities, tolerability, satisfaction with treatment, and adherence to it. Additionally, due to the absence of adverse events, evidence is added to that currently available that supports the use of *H. helix* EA575 safely in this age group [8, 11, 13, 18, 21].

The results obtained should be interpreted considering the limitations of this study, which has descriptive observational designs, where it is impossible to establish causality, association, or extrapolation of the results. On the contrary, using several validated and widely validated measurement tools to determine clinical evolution is a strength. It is also worth highlighting the generation of local evidence on the use of *Hedera helix* EA575 syrup in children from a study conducted under conditions of routine clinical practice of Colombian pediatricians. Having a follow-up for 14 days allowed us to describe the clinical course of the disease and establish the absence of adverse events during this period, emphasizing the product's safety, which is an aspect of great importance, especially when treating the pediatric population.

## CONCLUSION

After seven days of treatment with *Hedera helix* EA575 syrup, 50% of the patients presented complete improvement of the cough, and in the remaining 50%, the condition progressed with clear improvement. After 14 days, the percentage of improvement exceeded 76%, and the remaining patients had mild symptoms without the cough affecting their daily activities. With this treatment, there was a marked improvement in nocturnal awakening episodes, reaching a median of zero from day seven. Other symptoms, such as dyspnea or rales, were significantly controlled by day seven and completely controlled by day 14. Due to the results and the satisfaction found in physicians and patients, it is suggested that this treatment could be beneficial and of low risk for the management of acute bronchitis. Further experimental studies are required for a complete characterization of *Hedera helix's* efficacy and safety profile.



## FUNDING SOURCE

This research was funded by Megalabs Colombia SAS.

## CONFLICTS OF INTEREST

G.E.C and A.G.V have employment ties with Megalabs Colombia SAS.

## REFERENCES

1. M. Mahowald, B. Shahan, D. Forbes, Respiratory conditions: Lower respiratory tract infections, *FP Essent.*, **486**, 19-25 (2019).
2. M. Fu, H. Wushouer, L. Hu, N. Li, X. Guan, L. Shi, *et al.*, Outpatient prescribing pattern for acute bronchitis in primary healthcare settings in China, *NPJ Prim. Care. Respir. Med.*, **31**(1), 24 (2021).
3. E. Ramirez-Medina, C. Restrepo-Ortega, H. Olivares-Perez, M. Montañez-Cuberos, *Prevalencia de enfermedades respiratorias en los hogares y centros de desarrollo infantil del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar del municipio de Cúcuta durante el año 2018 y 2019*, Trabajo de Grado, Universidad de Santander, San José de Cúcuta, 2020.
4. P. Zhang, X. Zhou, Pricing air pollution: Evidence from short-term exposure to air pollution on hospitalization of acute bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease in southwestern China, *Int. Health*, **14**(6), 572-579 (2022).
5. R.H. Albert, Diagnosis and treatment of acute bronchitis, *Am. Fam. Physician*, **82**(11), 1345-1350 (2010).
6. J. Pérez-Sanz, Bronquitis y bronquiolitis, *Pediatría Integral*, **20**(1), 28-37 (2016).
7. P.M. Wopker, M. Schwermer, S. Sommer, A. Längler, K. Fetz, T. Ostermann, *et al.*, Complementary and alternative medicine in the treatment of acute bronchitis in children: A systematic review, *Complement. Ther. Med.*, **49**, 102217 (2020).

8. L.A. Barnes, M. Leach, D. Anheyer, D. Brown, J. Carè, R. Lauche, *et al.*, The effects of *Hedera helix* on viral respiratory infections in humans: A rapid review, *Adv. Integr. Med.*, **7**(4), 222-226 (2020).
9. A. Schaefer, M.S. Kehr, B.M. Giannetti, M. Bulitta, C. Staiger, A randomized, controlled, double-blind, multicenter trial to evaluate the efficacy and safety of a liquid containing ivy leaves dry extract (EA 575 (R)) vs. placebo in the treatment of adults with acute cough, *Pharmazie*, **71**(9), 504-509 (2016).
10. A. Schaefer, F. Ludwig, B.M. Giannetti, M. Bulitta, A. Wacker, Efficacy of two dosing schemes of a liquid containing ivy leaves dry extract EA 575 versus placebo in the treatment of acute bronchitis in adults, *ERJ Open Res.*, **5**(4), 00019-2019 (2019).
11. C. Lang, C. Staiger, T. Wegener, Efeu in der pädiatrischen Praxis Anwendung von EA 575® in der Therapie der akuten Bronchitis bei Schulkindern, *ZPT – Zeitschrift für Phytotherapie*, **36**, 192-196 (2015). URL: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0041-105237.pdf>
12. C. Lang, P. Röttger-Lüer, C. Staiger, A valuable option for the treatment of respiratory diseases: Review on the clinical evidence of the ivy leaves dry extract EA 575®, *Planta Med.*, **81**(12-13), 968-674 (2015).
13. S. Fazio, J. Pouso, D. Dolinsky, A. Fernandez, M. Hernandez, G. Clavier, *et al.*, Tolerance, safety and efficacy of *Hedera helix* extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: A prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients, *Phytomedicine*, **16**(1), 17-24 (2009).
14. H. Häberlein, F. Runkel, L. Prenner, Mecanismo de Acción Celular de los Extractos de la Hoja de Hiedra, Sociedad Iberoamericana de Información Científica, 2005. URL: [http://abrilaroriginal.cl/wp-content/files\\_mf/1401370141MecanismoAccionCelulardeLosExtractosdeLaHojadeHiedra.pdf](http://abrilaroriginal.cl/wp-content/files_mf/1401370141MecanismoAccionCelulardeLosExtractosdeLaHojadeHiedra.pdf)
15. C. Greunke, A. Hage-Hülsmann, T. Sorkalla, N. Keksel, F. Häberlein, H. Häberlein, A systematic study on the influence of the main ingredients of an ivy leaves dry extract on the  $\beta$ 2-adrenergic responsiveness of human airway smooth muscle cells, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **31**, 92-98 (2015).
16. J. Schulte-Michels, F. Runkel, S. Gokorsch, H. Häberlein, Ivy leaves dry extract EA 575® decreases LPS-induced IL-6 release from murine macrophages, *Pharmazie*, **71**(3), 158-161 (2016).

17. J. Schulte-Michels, C. Keksel, H. Häberlein, S. Franken, Anti-inflammatory effects of ivy leaves dry extract: influence on transcriptional activity of NFκB, *Inflammopharmacology*, **27**(2), 339-347 (2019).
18. M. Schmidt, M. Thomsen, U. Schmidt, Suitability of ivy extract for the treatment of paediatric cough, *Phytother. Res.*, **26**(12), 1942-1947 (2012).
19. S. Cañigueral-Folcará, Medicamentos a base de plantas: el reto de la calidad y la Farmacopea como herramienta para alcanzarla, *Revista de Fitoterapia*, **13**(2), 101-122 (2013).
20. E. Sierocinski, F. Holzinger, J.F. Chenot, Ivy leaf (*Hedera helix*) for acute upper respiratory tract infections: an updated systematic review, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **77**(8), 1113-1122 (2021).
21. F. Holzinger, J.F. Chenot, Systematic review of clinical trials assessing the effectiveness of ivy leaf (*Hedera Helix*) for acute upper respiratory tract infections, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, 382789 (2011).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

D. Madero-Oróstegui, G. Sánchez-Vanegas, F. Vera-Castro, A. Bastidas-Manzanares, A. Monterrosa-Blanco, G.E. Castro, A.G. Vallejos-Narvaez, Clinical evolution of acute bronchitis in Colombian children between 2 and 14 years treated with *Hedera helix* EA575 syrup, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 781-795 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106481>

## Análise das prescrições de psicofármacos de uma farmácia básica em um município do Curimataú Paraibano (Brasil)

Angelo Gabriel Caminha de Sousa<sup>1</sup>, Lysrayane Kerullen David Barroso<sup>2</sup>, Maria Emília da Silva Menezes<sup>3</sup>, Fernando de Sousa Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil. Correo eletrônico: angelosousa820@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil. Correo eletrônico: lysrayane@outlook.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil. Correo eletrônico: memenezes\_2@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Correo eletrônico: fernando07pb@gmail.com

\*Autor correspondente

Recebido: 31 de janeiro de 2023

Revisado: 26 de março de 2023

Aceto: 30 de março de 2023

### RESUMO

**Introdução:** psicotrópicos são substâncias que provocam alterações no sistema nervoso central e que comumente são utilizados para tratar diversos transtornos mentais que afetam um alto número de pessoas. Sabe-se que grande parte desta classe de medicamentos, detém um alto risco de provocar dependência e que o uso constante e indiscriminado pode trazer diversos riscos à saúde. **Objetivo:** avaliar a prescrição de psicofármacos na farmácia básica de Cuité-PB. **Metodologia:** essa pesquisa corresponde a um estudo transversal, quantitativo e do tipo descritivo, em que participaram 200 usuários de psicotrópicos atendidos na farmácia básica de Cuité-PB. A coleta dos dados se deu de novembro de 2020 a junho de 2021. **Resultados:** observou-se uma prevalência de indivíduos do sexo feminino (58,5%), solteiros (43,5%) e adultos (49,5%), com baixos níveis de escolaridade (48,0%) e renda mensal baixa (43,5%). Prevaleram usuários sem ocupação (27,0%), agricultores (17,0%) e aposentados (17,0%), com família de, no máximo, 3 membros (63,0%). Os agentes psicoativos mais prescritos foram clonazepam (21,4%), amitriptilina (13,2%) e diazepam (12,5%), adquiridos com prescrições obtidas da rede pública de saúde. Geralmente, o tempo de utilização era de 1 a 5 anos (43,5%). Quanto às poten-

ciais interações medicamentosas, foi detectado a presença de 33 interações, sendo a mais frequente a associação entre diazepam e haloperidol, encontradas em 8 prescrições e classificadas como moderadas. Das prescrições avaliadas, 3 apresentaram inconformidades relacionadas, principalmente, à posologia. **Conclusão:** observa-se um considerável uso de psicotrópicos, necessitando um acompanhamento mais adequado por parte dos profissionais de saúde.

**Palavras-chave:** Uso de medicamentos, psicotrópicos, saúde pública.

## RESUMEN

### Análisis de prescripciones de psicofármacos de una Farmacia Básica de un municipio de Curimataú Paraibano (Brasil)

**Introducción:** los psicotrópicos son sustancias que provocan cambios en el sistema nervioso central y son comúnmente utilizados para tratar diversos trastornos mentales que afectan a un gran número de personas. Se sabe que gran parte de esta clase de fármacos tiene un alto riesgo de causar dependencia y que su uso constante e indiscriminado puede traer diversos riesgos para la salud. **Objetivo:** evaluar la prescripción de psicofármacos en la farmacia básica de Cuité-PB. **Metodología:** esta investigación corresponde a un estudio transversal, cuantitativo y descriptivo, en el que participaron 200 usuarios de psicotrópicos atendidos en la farmacia básica de Cuité-PB. La recolección de datos ocurrió de noviembre de 2020 a junio de 2021. **Resultados:** predominó el sexo femenino (58,5%), soltero (43,5%) y adulto (49,5%), con baja escolaridad (48,0%) y baja renta mensual (43,5%). Prevalcieron los usuarios desocupados (27,0%), agricultores (17,0%) y jubilados (17,0%) con familia máxima de 3 miembros (63,0%). Los agentes psicoactivos más recetados fueron clonazepam (21,4%), amitriptilina (13,2%) y diazepam (12,5%), adquiridos con recetas obtenidas en la red pública de salud. Generalmente, el tiempo de uso fue de 1 a 5 años (43,5%). En cuanto a las posibles interacciones medicamentosas, se detectó la presencia de 33 interacciones, siendo la más frecuente la asociación entre diazepam y haloperidol, encontrada en 8 prescripciones y clasificada como moderada. De las prescripciones evaluadas, 3 tuvieron incumplimiento relacionado principalmente con la dosificación. **Conclusión:** existe un uso considerable de psicofármacos, requiriendo un seguimiento más adecuado por parte de los profesionales de la salud.

**Palabras clave:** Consumo de drogas, psicofármacos, salud pública.

## SUMMARY

### Analysis of psychotropic drug prescriptions of the Basic Pharmacy in a municipality of Curimataú Paraibano (Brazil)

**Introduction:** Psychotropics are substances that cause changes in the central nervous system and are commonly used to treat various mental disorders that affect many people. It is known that a large part of this class of drugs has a high risk of causing dependence, and that constant and indiscriminate use can bring various health risks. **Aim:** To evaluate the prescription of psychotropic drugs in the Basic Pharmacy of Cuité-PB. **Methodology:** This research corresponds to a cross-sectional, quantitative, and descriptive study, in which 200 users of psychotropics attended at the basic pharmacy of Cuité-PB participated. Data collection took place from November 2020 to June 2021. **Results:** There was a prevalence of female individuals (58.5%), single (43.5%) and adults (49.5%), with low levels of education (48.0%) and low monthly income (43.5%). Unemployed users (27.0%), farmers (17.0%) and retirees (17.0%) with a maximum family of 3 members (63.0%) prevailed. The most prescribed psychoactive agents were clonazepam (21.4%), amitriptyline (13.2%) and diazepam (12.5%), purchased with prescriptions obtained from the public health network. Generally, the time of use was from 1 to 5 years (43.5%). As for potential drug interactions, the presence of 33 interactions was detected, the most frequent being the association between diazepam and haloperidol, found in 8 prescriptions and classified as moderate. Of the evaluated prescriptions, 3 had non-compliance mainly related to dosage. **Conclusion:** There is a considerable use of psychotropic drugs, requiring more adequate monitoring by health professionals.

**Keywords:** Drug use, psychotropic drugs, public health.

## INTRODUÇÃO

Psicotrópicos, psicofármacos ou agentes psicoativos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas que, quando administradas no organismo, podem alterar de várias formas o comportamento mental, excitando, deprimindo ou provocando perturbações [1]. Comumente, são prescritos a indivíduos portadores de transtornos emocionais e psíquicos ou com outros tipos de problemas, que prejudicam a boa atividade mental [2].

Nos últimos anos, é notável o crescimento do consumo dessa classe de medicamentos, como pode ser visto na Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso

Racional de Medicamentos no Brasil (PNAUM). Dentre os 20 subgrupos farmacológicos em maior consumo na atenção primária, estão os antidepressivos, com destaque para a fluoxetina, os antiepiléticos e os ansiolíticos, especialmente o clonazepam. Com consumo superior a estas classes de psicotrópicos, estão apenas os anti-inflamatórios não esteroidais, os anti-hipertensivos e os antidiabéticos [3].

O alto índice de consumo dos psicotrópicos pode ser explicado pelo crescente número de diagnósticos, do surgimento de novos fármacos psicoativos e as novas indicações de uso de alguns fármacos já existentes [4]. Como consequência ao aumento da utilização de psicofármacos, surge a polifarmácia psiquiátrica, caracterizada pelo uso de dois ou mais psicoativos de forma simultânea, por um mesmo paciente [5]. Isso aumenta a exposição do paciente a efeitos adversos e interações medicamentosas. Dessa forma, o conceito de Uso Racional de Medicamentos (URM) é de fundamental importância para a promoção da saúde [6].

Com isso, estudos referentes à utilização de medicamentos são essenciais para promoção do URM, pois podem revelar e avaliar o padrão no consumo de fármacos e as necessidades de saúde de uma determinada população [7].

Neste sentido, dada a importância de se conhecer o atual consumo de psicotrópicos no município de Cuité/PB, o presente estudo se propôs a avaliar o perfil do uso de psicotrópicos dispensados na farmácia básica deste município. Esse tipo de pesquisa é importante, pois fornecerá informações sobre os psicotrópicos mais consumidos, variáveis sociais e demográficas que influenciam o uso deste tipo de medicamento, bem como, analisará o cumprimento das prescrições, de acordo com a Portaria Nº 344/98 da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde [8].

## METODOLOGIA

Corresponde a um estudo transversal, quantitativo e do tipo descritivo, cujo seguimento amostral foram usuários de psicotrópicos. Sitta *et al.* dizem que os estudos transversais são indicados quando se deseja estimar a frequência com que um determinado evento de saúde se manifesta, além de determinar indicadores globais de saúde para o grupo investigado [9].

O município de Cuité, com uma área de 733,818 km<sup>2</sup>, está localizado na mesorregião do Agreste Paraibano, microrregião do Curimataú Ocidental da Paraíba/Brasil. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o município conta com uma população estimada em 20.331 habitantes, e com densidade demográfica de 26,93 hab./km<sup>2</sup>. O município situa-se a 235 km da capital do Estado, João Pessoa [10].

A amostra foi composta por 200 usuários residentes do município de Cuité/PB, que faziam o uso de psicotrópicos no momento da pesquisa. Todos os entrevistados foram provenientes da farmácia básica do município. Foram avaliadas as receitas e as notificações de receita do tipo controle especial prescrita por profissional habilitado. Para a avaliação foram considerados os critérios da portaria n.º 344/98 - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde de 12 de maio de 1998 [8]. Os critérios observados foram: a validade da receita, assinatura e carimbo do profissional, conformidade do medicamento com a receita ou notificação e posologia.

O instrumento de coleta de dados foi um questionário baseado nos estudos de Silva (2009), dividido em três partes [11]. Na primeira, foram abordados dados de identificação dos entrevistados, como: idade, sexo, situação conjugal, grau de escolaridade, zona onde reside, ocupação, número de membros da família e renda familiar mensal. Na segunda, informações sobre aquisição e utilização do medicamento, como: tempo de utilização, desencadeamento de possíveis reações desagradáveis, local de consulta e aquisição da receita, acompanhamento profissional regular e informações fornecidas pelo profissional prescritor. Por fim, dados referentes à prescrição, como: nome e concentração do psicofármaco, posologia, formação e especialidade do prescritor, bem como avaliação da adequabilidade da receita à legislação vigente. O questionário foi respondido pelo usuário após a aquisição do medicamento, sendo realizada uma explicação prévia sobre a finalidade da pesquisa.

Os critérios de inclusão de voluntários para essa pesquisa foram: ser residente em Cuité e utilizar o serviço da Farmácia Básica; ter 18 anos ou mais de idade; estar de posse da receita ou notificação de receita, com prescrição de profissional habilitado; ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios de exclusão para essa pesquisa foram: usuários que não faziam uso de psicotrópicos; que após os devidos esclarecimentos sobre o estudo se recusaram a participar; que não se enquadraram nos critérios de inclusão ou com déficit cognitivo, ou ainda com alteração na comunicação.

Para identificação das possíveis interações medicamentosas foi utilizado o programa *Interaction Checker*, pertencente ao banco de dados do programa *Medscape*®, com acesso em rede. No tocante aos medicamentos potencialmente inapropriados (MPI) para idosos, estes foram identificados por meio dos critérios de *Beers-Fick*. Após a coleta, foram realizadas as tabulações e cruzamentos dos dados. Após a digitação, o banco de dados foi transferido para o Programa *Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows* versão 13.0. O SPSS é um programa para análises estatísticas de dados, utilizando-se de menus e janelas de diálogo, que permitem realizar cálculos complexos e visualizar resultados.



Este estudo foi desenvolvido levando-se em consideração os aspectos éticos de pesquisa envolvendo seres humanos, preconizado pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde [12]. Os sujeitos foram informados quanto à garantia da preservação do anonimato, da privacidade e do livre consentimento, podendo o mesmo desistir de participar a qualquer momento.

A Farmacêutica responsável pela farmácia básica também recebeu o termo de consentimento informado. A pesquisa esteve em conformidade com a Resolução do Conselho Federal de Farmácia Nº 417 do Código de Ética da Profissão Farmacêutica [13], bem como, foi previamente submetida à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, sob o parecer de número: 4.474.394.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, estão descritos dados sobre o sexo, situação conjugal e idade dos usuários entrevistados. Como pode ser observado, houve uma quantidade maior de usuárias do sexo feminino (58,5%). Boyd *et al.* relataram que, em seu estudo, há uma maior prevalência de indivíduos do sexo feminino com transtornos mentais [14]. As mulheres podem possuir uma maior suscetibilidade a transtornos mentais, devido a variações que ocorrem no sistema endócrino no período pré-menstrual, pós-parto e menopausa [15]. Adicionalmente, as mulheres procuram com maior frequência os serviços de saúde do que os homens [16].

**Tabela 1.** Sexo, situação conjugal e idade dos usuários de psicotrópicos da farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Variáveis	Frequência	%
<b>Sexo</b>		
Feminino	117	58,5
Masculino	83	41,5
<b>Situação conjugal</b>		
Solteiro	87	43,5
Casado	49	24,5
Viúvo	18	9,0
Divorciado(a)	13	6,5
Outros	33	16,5
<b>Idade</b>		
18 a 37 anos	59	29,5
38 a 59 anos	99	49,5
≥ 60 anos	42	21,0

Com relação à situação conjugal, houve uma maior participação de indivíduos que se declararam solteiros (43,5%). Por outro lado, em um estudo de Medeiros Filho *et al.*, realizado na cidade de Caicó, Rio Grande do Norte, houve uma maior média de casados ou em união estável [17]. Isso demonstra que essa variável pode depender de fatores associados à população a ser analisada. A presença de usuários adultos na faixa etária de 38 a 59 anos (49,5%) foi a mais presente. De forma semelhante ao presente estudo, Kantorski *et al.* avaliaram a prevalência do uso de psicotrópicos em usuários de saúde mental e demonstrou que, dentre os 389 participantes, 285 possuíam faixa etária entre 31 e 60 anos. Isso demonstra que o uso de psicotrópicos por adultos é mais comum em relação a idosos [18].

Conforme a tabela 2, a soma dos usuários com baixo grau de escolaridade representados por não alfabetizados (13,0%) e os que possuem fundamental incompleto (48,0%) foi mais prevalente. Quanto à ocupação, houve um maior número de indivíduos sem ocupação (27,0%), aposentados (17,0%) e agricultores (17,0%).

Rodrigues *et al.* (2020) buscaram analisar a prevalência de uso de psicotrópicos, segundo características sociodemográficas na população adulta e idosa dentre os dados levantados pela PNAUM de 2014 [19]. De acordo com o obtido, indivíduos de grau de escolaridade mais baixo, com estudos de até 8 anos, representavam 58,3% do total. A partir do exposto, é notável que o grau de escolaridade é um fator considerável no quesito saúde mental. Em relação à ocupação, o nível de pessoas que não a possuem, pode ser decorrente da crise econômica em que o país se encontra e os baixos níveis de escolaridade apresentados. Dessa forma, a falta de ocupação pode ser um fator para o adoecimento mental [20].

Como demonstrado na tabela 3, houve o predomínio de famílias compostas por 1 a 3 pessoas (63%). Esse dado pode ter relação com a tendência do declínio do número de filhos na atualidade devido à mudança dos parâmetros sociais, pois em modelos antigos, era comum as famílias possuírem um maior número de filhos [21]. O menor percentual encontrado para esta variável foi o de famílias compostas por 7 pessoas ou mais.

**Tabela 2.** Nível de escolaridade e ocupação dos usuários de psicotrópicos da farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Variáveis	Frequência	%
<b>Escolaridade</b>		
Não alfabetizados	26	13,0
Fundamental incompleto	96	48,0
Fundamental completo	10	5,0
Médio incompleto	15	7,5
Médio completo	41	20,5
Superior incompleto	8	4,0
Superior completo	1	0,5
Pós-graduado	3	1,5
<b>Ocupação</b>		
Aposentado	34	17,0
Agricultor	34	17,0
Dona de casa	25	12,5
Autônomo	13	6,5
Funcionário público	11	5,5
Auxiliar de serviços gerais	6	3,0
Comerciante	5	2,5
Estudantes	4	2,0
Incapaz	14	7,0
Não possui	54	27,0

**Tabela 3.** Número de membros na família e renda mensal dos usuários de psicotrópicos da farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Variáveis	Frequência	%
<b>Número de membros na família</b>		
1 a 3	126	63,0
4 a 6	66	33,0
≥ 7	8	4,0
<b>Renda</b>		
< 1 Salário mínimo	65	32,5
1 a 1,5 Salário mínimo	87	43,5
2 a 2,5 Salário mínimo	19	9,5
≥ 3 Salário mínimo	11	5,5
Não informado	18	9,0

\*Salário mínimo em 2021: 1.100,00 reais

Quanto à variável “renda”, observou-se predomínio de famílias com renda mensal de 1 a 1,5 salário mínimo (43,5%), seguida pelas famílias com renda menor que 1 salário mínimo (32,5%). De acordo com dados do IBGE, o salário médio mensal do trabalhador formal do município de Cuité é de 1,6 salários mínimos [10]. Resultados referentes a renda também foram demonstrados por Medeiros Filho *et al.* (2018) que prevaleceu a renda de até 1 salário mínimo dentre os entrevistados [17]. Isso demonstra que pessoas com menor renda podem ter o maior risco de adoecimento mental.

Segundo a tabela 4, com relação ao tempo de uso, as respostas mais frequentes foram a de pessoas que faziam uso de medicamentos entre 1 a 5 anos (35,5%). Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2015) com usuários da atenção básica de um município de Minas Gerais, a maioria dos questionados utilizavam psicofármacos há mais de 3 anos [22]. Além disso, no presente estudo, houve entrevistados que relataram sentir reações desagradáveis em função do uso de psicotrópicos (15,0%). Dentre as reações desagradáveis mais frequentes, duas tiveram mais destaque: sonolência e dor estomacal. Tais resultados corroboram com os encontrados por Medeiros Filho *et al.*, cuja reação desagradável mais presente em sua pesquisa foi a sonolência, explicada pela utilização de fármacos depressores do SNC [17]. O uso de vários psicotrópicos pode também agredir a mucosa gástrica, causando dor estomacal. Nota-se, de acordo com os dados, que o maior percentual dos usuários entrevistados provém da rede pública de atendimento, principalmente, das Unidades Básicas de Saúde (62,5%) e do Centro de Atendimento Psicossocial (23,5%), já que uma significativa parcela da população é de baixa renda, como descrito anteriormente. Conforme o estudo de Moliner e Lopes, a presença do atendimento à saúde mental no nível primário de atenção é muito relevante, pois possibilita um acesso mais simplificado quando comparado a outros serviços e contribui para bons índices de saúde mental da comunidade [23].

Na tabela 5, observa-se que uma significativa parcela dos entrevistados não realiza acompanhamento médico. Isso pode representar a presença da prática de renovação de receita, que é muito comum nos serviços de atenção básica do Brasil, trazendo altos riscos à saúde dos usuários por carecer do contato do paciente com o profissional de saúde. Assim sendo, pode levar o paciente ao uso de medicamentos de indicação duvidosa, como também reações adversas e interações medicamentosas graves ou até a utilização de medicamentos não mais necessários e por tempo prolongado [24]. Essa renovação deve ser acompanhada por um profissional qualificado, como por exemplo, um farmacêutico habilitado em prescrição e farmácia clínica.

**Tabela 4.** Características relacionadas à utilização de psicotrópicos dos usuários da farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Variáveis	Frequência	%
<b>Tempo de uso</b>		
< 1 ano	34	17,0
De 1 a 5 anos	71	35,5
De 6 a 10 anos	43	21,5
De 11 a 15 anos	24	12,0
De 16 a 20 anos	8	4,0
> 21 anos	20	10,0
<b>Reação desagradável</b>		
Sim	30	15,0
Não	170	85,0
<b>Local de recebimento da receita</b>		
UBS	125	62,5
CAPS	47	23,5
Consultório particular	9	4,5
Hospital público	7	3,5
Outros	12	6,0

**Tabela 5.** Acompanhamento, interrupção e informações prestadas aos usuários de psicotrópicos da farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Variáveis	Frequência	%
<b>Acompanhamento médico</b>		
Regular	119	59,5
Irregular	81	40,5
<b>Já interrompeu o tratamento</b>		
Sim	107	53,5
Não	93	46,5
<b>Informações fornecidas pelo médico</b>		
Como tomar	27	13,5
Finalidade	40	20,0
Risco de vício ou dependência	5	2,5
Efeitos colaterais	7	3,5
Como tomar e finalidade	10	5,0
Nenhuma	111	55,5

A ausência desses medicamentos na farmácia básica ocorre pelo fato dos fornecedores, algumas vezes, não cumprirem com os prazos de entrega, deixando o estabelecimento de promoção à saúde desabastecido e a população desassistida. Porém, ao final, os pacientes retornavam ao uso dos psicotrópicos. Outra justificativa para a interrupção é o paciente considerar que estava curado e o receio de que a utilização contínua desses medicamentos pode provocar dependência física e psíquica, bem como trazer prejuízos à vida como: diminuição da memória, atenção, força muscular e potência sexual. A continuação do tratamento de maneira ininterrupta é essencial para o sucesso terapêutico [25].

Referente às informações fornecidas pelos profissionais prescritores, mais da metade dos entrevistados relatou que não houve informação prestada. Um estudo realizado em um município da Paraíba envolvendo usuários de psicotrópicos, a maior parte dos entrevistados relataram não ter acompanhamento médico regular. Dos que relataram realizar acompanhamento médico, cerca de 46,0% expressaram insatisfação perante o atendimento médico [26]. Isso ressalta a necessidade de haver um atendimento à saúde que integre profissionais de diferentes especialidades, e que inclua o farmacêutico com maior proximidade aos pacientes. Dessa forma, o atendimento à saúde tende a ficar mais eficaz.

De acordo com a tabela 6, o fármaco clonazepam, da classe dos benzodiazepínicos, foi o mais prescrito. Logo em seguida, surge a amitriptilina pertencente à classe dos antidepressivos tricíclicos, que obteve um alto número de dispensações. Em estudo semelhante, Braga *et al.* em Água Doce, Santa Catarina, obtiveram um resultado próximo, sendo os benzodiazepínicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina as classes mais prescritas, representados principalmente por clonazepam e fluoxetina, respectivamente. Essas classes de fármacos, devido ao baixo custo e fácil aquisição, geralmente representam os mais prescritos pela rede pública municipal [27].

**Tabela 6.** Quantidade de psicotrópicos dispensados na farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Fármacos	N	%
Ácido valproico 250 mg	6	2,1
Ácido valproico 500 mg	8	2,8
Amitriptilina 25 mg	37	13,2
Aripiprazol 10 mg	1	0,4
Biperideno 2 mg	7	2,5
Bupropiona 150 mg	2	0,7
Carbamazepina 200 mg	15	5,4
Carbamazepina 400 mg	3	1,1

(Continue)

Fármacos	N	%
Citalopram 20 mg	4	1,4
Clomipramina 25 mg	1	0,4
Clonazepam 0,5 mg	13	4,6
Clonazepam 2 mg	45	16,1
Clonazepam 2,5 mg/mL	2	0,7
Clorpromazina 25 mg	3	1,1
Clorpromazina 100 mg	3	1,1
Desvenlafaxina 100 mg	1	0,4
Diazepam 5 mg	3	1,1
Diazepam 10 mg	32	11,4
Divalproato 250 mg	2	0,7
Duloxetina 30 mg	1	0,4
Duloxetina 60 mg	2	0,7
Escitalopram 20 mg	1	0,4
Fenitoína 100 mg	4	1,4
Fenobarbital 100 mg	12	4,3
Fluoxetina 20 mg	25	8,9
Haloperidol 1 mg	4	1,4
Haloperidol 5 mg	10	3,6
Lamotrigina 50 mg	1	0,4
Levomepromazina 25 mg	1	0,4
Levomepromazina 100 mg	3	1,1
Lorazepam 2 mg	1	0,4
Mirtazapina 30 mg	1	0,4
Pregabalina 75 mg	4	1,4
Risperidona 2 mg	4	1,4
Sertralina 50 mg	14	5,0
Sertralina 25 mg	1	0,4
Trazodona 10 mg	1	0,4
Venlafaxina 75 mg	1	0,4
Venlafaxina 100 mg	1	0,4

No tocante a tabela 7, a especialidade profissional que mais emitiu prescrições foi a de médico clínico geral, seguida pelos médicos psiquiatras. Os percentuais referentes às especialidades dos profissionais prescritores é similar ao identificado por Balen *et al.* em um município no Oeste do Paraná/Brasil, em que os profissionais que mais prescreveram psicotrópicos foram os psiquiatras, e, logo em seguida, clínicos gerais [28]. Ainda assim, é importante considerar o alto índice de clínicos gerais que prescrevem psicotrópicos e atendem pacientes que têm transtornos mentais. O profissional mais qualificado para essa atividade é o psiquiatra; entretanto, esse profissional não está dis-

ponível em muitas cidades do interior do Brasil. Quanto à avaliação da receita, três apresentaram inconformidades, representadas, principalmente, pela ausência da posologia a ser adotada pelo paciente. O alto índice de conformidade das receitas indica que a dispensação de psicotrópicos está de acordo com a Portaria N° 344/98 do MS para medicamentos sujeitos a controle especial [8].

**Tabela 7.** Especialidade profissional e conformidade das receitas e notificações dos psicotrópicos dispensados na farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=200).

Especialidade médica	N	%
Clínico geral	122	61,0
Psiquiatra	47	23,5
Ginecologista	17	8,5
Geriatra	7	3,5
Neurologista	2	1,0
Pediatra	2	1,0
Cardiologista	1	0,5
Ortopedista	1	0,5
Infectologista	1	0,5
<b>Avaliação da receita</b>		
Preenchida corretamente	197	98,5
Não preenchida corretamente	3	1,5

No presente estudo, 34 idosos participaram da pesquisa. Levando-se em consideração os critérios de *Beers-Fick* e, de acordo com a tabela 8, o clonazepam foi o MPI mais prescrito, presente em 13 prescrições. Esse resultado corrobora a revisão realizada por Moreno *et al.* (2018), pois os benzodiazepínicos foram os fármacos mais utilizados frente a utilização de outros fármacos em idosos [29].

Segundo Oliveira *et al.* (2016), a classe dos benzodiazepínicos amplia o risco de comprometimento cognitivo, *delirium*, quedas, fraturas e acidentes automobilísticos, principalmente em idosos [30]. Dessa forma, podem comprometer a segurança de vida dos idosos e diminuir a qualidade de vida, afetando de maneira negativa a vida desse público.

A tabela 9 demonstra algumas das principais potenciais interações medicamentosas presentes nas prescrições avaliadas durante a pesquisa. A potencial interação mais presente foi do tipo moderada entre o fármaco diazepam em associação com haloperidol. Esse tipo de associação foi observado em 8 prescrições. Esses fármacos são depressores do SNC, e em associação, podem causar sedação aumentada por sinergismo farmacológico.



**Tabela 8.** Medicamentos potencialmente inapropriados dispensados para idosos na farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=34).

Fármacos	N	%
Clonazepam 2 mg	10	27,8
Amitriptilina 25 mg	6	16,7
Diazepam 10 mg	5	13,9
Fenobarbital 100 mg	5	13,9
Carbamazepina 200 mg	2	5,6
Clonazepam 2,5 mg	2	5,6
Fluoxetina 20 mg	2	5,6
Clonazepam 0,5 mg	1	2,8
Diazepam 5 mg	1	2,8
Haloperidol 5 mg	1	2,8
Lorazepam 2 mg	1	2,8

**Tabela 9.** Potenciais interações medicamentosas entre psicotrópicos dispensados na farmácia básica do município de Cuité-PB, 2021 (N=33).

Fármacos (mg)	N	Severidade	Efeito da interação
Diazepam 10 / Carbamazepina 200	5	Alta	Carbamazepina é indutora da CYP3A4 diminuindo o nível ou efeito do diazepam
Carbamazepina 200 / Amitriptilina 25	2	Moderada	Carbamazepina é indutora da CYP3A4 diminuindo o nível ou efeito da amitriptilina
Amitriptilina 25 / Clonazepam 2	7	Moderada	Aumentam a sedação por sinergismo farmacológico
Diazepam 10 / Haloperidol 5	8	Moderada	Aumentam a sedação por sinergismo farmacológico
Fenobarbital 100 / Carbamazepina 200	3	Moderada	Fenobarbital é indutor da CYP3A4 diminuindo o nível ou efeito da carbamazepina
Fenitoína 100 / Ácido valproico 250	2	Moderada	O ácido valproico é inibidor da enzima hepática CYP2C9/10 aumentando o nível ou efeito da fenitoína

*(Continue)*

Fármacos (mg)	N	Severidade	Efeito da interação
Amitriptilina 25 / Fluoxetina 25	3	Alta Alta	Fluoxetina é inibidora da enzima hepática CYP2C19 aumentando o nível ou efeito da amitriptilina Fluoxetina e amitriptilina aumentam os níveis de serotonina
Clonazepam 2 / Haloperidol 5	1	Moderada	Aumentam a sedação por sinergismo farmacológico
Fenobarbital 100 / Fenitoína 100 / Haloperidol 5	1	Alta	Fenobarbital e fenitoína são indutores da CYP3A4 diminuindo o nível ou efeito do haloperidol
Pregabalina 75 / Duloxetina 60	1	Moderada	Interagem por sinergismo com aumento de seus efeitos. A coadministração pode resultar em depressão respiratória grave com risco de vida

Em estudo realizado por Marini e Turatti (2014), foi encontrado um resultado semelhante, em que o fármaco mais presente em potenciais interações foi também o diazepam [31]. No entanto, nesse estudo, a associação mais presente foi a do diazepam com a fluoxetina. Em outro estudo publicado por Ferreira Júnior *et al.* (2021), em um município de Minas Gerais, o medicamento mais prescrito foi o diazepam, sendo a associação do biperideno e haloperidol, a mais frequente, considerada como do tipo moderada [32].

É inegável que os fármacos psicotrópicos trouxeram um avanço enorme na terapia farmacológica dos transtornos mentais e isso representou uma mudança de cenário da saúde mental, permitindo a permanência desses indivíduos no contexto social [27]. Entretanto, devido aos inúmeros efeitos adversos, o uso desses fármacos precisa ser racionalizado e a participação do farmacêutico no acompanhado de uso, pode representar um aumento da efetividade terapêutica, manejo de reações adversas e interações medicamentosas, impactando de forma positiva na melhora da qualidade de vida do usuário.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, por meio da análise das prescrições de psicotrópicos na farmácia básica do município de Cuité-PB, pode-se inferir que o usuário de psicotrópicos da rede pública de Cuité é, no geral, do sexo feminino, solteiro e adulto, com baixo grau de escolaridade. Apresenta-se como uma pessoa sem algum tipo de ocupação, proveniente de famílias compostas por, no máximo, 3 membros, e utiliza psicotrópicos por um período de 1 a 5 anos, receitados na rede pública de saúde.

As prescrições não eram acompanhadas de informação prestadas pelo prescritor. O clonazepam, a amitriptilina e o diazepam foram os fármacos mais prescritos por clínicos gerais ou psiquiatras por meio de receitas que atediam as normas vigentes.

Além disso, todos os usuários idosos entrevistados faziam uso de pelo menos um MPI, sendo os mais utilizados: clonazepam, diazepam e amitriptilina. Referente às interações medicamentosas, observou-se a presença de 33, em que a mais frequente foi a associação entre o diazepam e haloperidol. Contudo, observa-se um considerável uso de psicotrópicos na rede pública, sendo necessário a sensibilização dos profissionais prescritores e demais profissionais de saúde frente a utilização desses fármacos para alcançar o uso racional.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe da farmácia básica do município de Cuité/PB pela colaboração na coleta de dados e aos entrevistados que, gentilmente, cederam as informações necessárias a esse estudo; e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por meio do PIBIC – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

## REFERÊNCIAS

1. J.R.F. Oliveira, F.R. Varallo, M. Jirón, I.M.L. Ferreira, M.R. Sianni-Morello, V.D. Lopes, L.R.L. Pereira, Descrição do consumo de psicofármacos na atenção primária à saúde de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, *Cadernos de Saúde Pública*, **37**(1), e00060520 (2021).
2. D.C.N. Moura, J.R. Pinto, P. Martins, K.A. Pedrosa, M.G.D. Carneiro, Uso abusivo de psicotrópicos pela demanda da estratégia saúde da família: revisão integrativa da literatura, *Revista de Políticas Públicas*, **15** (2), 136-144 (2016).
3. Brasil, Ministério da saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, *Componente avaliação dos serviços de assistência farmacêutica básica: resultados*, Brasília, 2017. URL: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/>

componente\_avaliacao\_assistencia\_pnaum\_caderno4.pdf, Consultado em: 04 de fevereiro de 2022.

4. M.A.M.B. Prado, P.M.S.B. Francisco, M.B.A. Barros, Uso de medicamentos psicotrópicos em adultos e idosos residentes em Campinas, São Paulo: um estudo transversal de base populacional, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, **26**(1), 111-222 (2017).
5. A. Bosetto, C.M. Silva, L.D. Peder, Interações medicamentosas entre psicofármacos e a relação com perfil de prescritores e usuários, *Journal Health NPEPS*, **5**(1), 187-206 (2020).
6. S.N. Silva, M.G. Lima, C.M. Ruas, Uso de medicamentos nos Centros de Atenção Psicossocial: análise das prescrições e perfil dos usuários em diferentes modalidades do serviço, *Ciência e Saúde Coletiva*, **25**(7), 2871-2881 (2020).
7. M.M. Abi-Ackel, M.F. Lima-Costa, E. Castro-Costa, A.I. Loyola Filho, Uso de psicofármacos entre idosos residentes em comunidade: prevalência e fatores associados, *Revista Brasileira de Epidemiologia*, **20**(1), 57-69 (2017).
8. Brasil, Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998, Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial, DOU, Brasília, DF, 31 dez., 1998. URL: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344\\_12\\_05\\_1998\\_rep.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html), Consultado em 04 de fevereiro de 2022.
9. E.I. Sitta, A.M. Arakawa, M.L. Caldana, S.H.C.S. Peres, A contribuição de estudos transversais na área da linguagem com enfoque em afasia, *Revista CEFAC*, **12**(6), 1059-1066 (2010).
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). URL: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pb/cuite.html>, Consultado em 26 de abril de 2022.
11. D.M.C. Silva, *Avaliação do consumo de medicamentos psicotrópicos no município de Pacatuba*, Monografia de Especialização em Vigilância Sanitária, Escola de Saúde Pública do Ceará, Fortaleza, 2009, 51 f.
12. Brasil, Conselho Nacional de Saúde, Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, Brasília, 2012. URL: [http://www.conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/index.html](http://www.conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html), Consultado em: 04 de fevereiro de 2022.

13. Conselho Federal de Farmácia, Resolução N° 596 de 21 de fevereiro de 2014, Dispõe sobre o Código de Ética Farmacêutica, o Código de Processo Ético e estabelece as infrações e as regras de aplicação das sanções disciplinares, Brasília, 2014. URL: <http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/596.pdf>, Consultado em: 24 de janeiro de 2022.
14. A. Boyd, S. Van de Vele, M. Pivette, M. Ten Have, S. Florescu, S. O'Neill, J.M. Caldas-de-Almeida, G. Vilagut, J.M. Haro, J. Alonso, V. Kovess-Masféty, Gender differences in psychotropic use across Europe: Results from a large cross-sectional, population-based study, *European Psychiatry*, **30**(6), 778-788 (2015).
15. D. Joel, Z. Berman, I. Tavor, N. Wexler, O. Gaber, Y. Stein, N. Shefi, J. Pool, S. Urchs, D.S. Marguiles, F. Liem, J. Hanggi, L. Jancke, Y. Assaf, Sex beyond the genitalia: the human brain mosaic, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **112**(50), 15468-15473 (2015).
16. M.E.A. Araújo, M.T. Silva, K.R.C. Andrade, T.F. Galvão, M.G. Pereira, Prevalência de utilização de serviços de saúde no Brasil: revisão sistemática e metanálise, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, **26**(3), 589-604 (2017).
17. J.S.A. Medeiros Filho, D.M. Azevedo, T.R. Pinto; G.W.S. Silva, Uso de psicofármacos na atenção primária à saúde, *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, **31**(3), 1-12 (2018).
18. L.P. Kantorski, C.A.S. Treichel, C.G. Santos, E.S. Menezes, M.D. Almeida, P.F. Alves, V.M.R. Jardim, Prevalence of psychotropic drug use and conformity of therapeutic dose among mental health users, *Revista Brasileira de Enfermagem*, **74**(6), e20200679 (2021).
19. P.S. Rodrigues, P.M.S.B. Francisco, A.T. Fontanella, R.B. Borges, K.S. Costa, Uso e fontes de obtenção de psicotrópicos em adultos e idosos brasileiros, *Ciência & Saúde Coletiva*, **25**(11), 4601-4614 (2020).
20. F.A.C. Mascena, A.P.C. Teixeira, F.S. Oliveira, Análise das prescrições de antimicrobianos dispensados pela farmácia básica de Cuité-PB, *Revista Saúde e Ciência*, **9**(2), 25-39 (2020).
21. G.M.D. Miranda, A.C.G. Mendes, A.L.A. da Silva, Desafios das políticas públicas no cenário de transição demográfica e mudanças sociais no Brasil, *Interface - Comunicação, Saúde, Educação*, **21**(61), 309-320 (2017).

22. V.P. Silva, N.C.L. Botti, V.C. Oliveira, E.A.A. Guimarães, Perfil epidemiológico dos usuários de benzodiazepínicos na atenção primária à saúde, *Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro*, **5**(1), 1393-1400 (2015).
23. J. Moliner, S.M.B. Lopes, Saúde mental na atenção básica: possibilidades para uma prática voltada para a ampliação e integralidade da saúde mental, *Saúde e Sociedade*, **22**(4), 1072-1083 (2013).
24. I.L.F. Reis, L.F.C. Alves, L.D.R. Cunha, M.A.P. Cavalli, R.A.T. Aguiar, Renovação de prescrição médica na atenção primária: uma análise crítica, *Revista Médica de Minas Gerais*, **1936**(28), e-1936 (2018).
25. M.S. Farias, A.B. Silva, D.R. Furtado, J.N.F. Silva, L.B. Oton, E.M. Souza, R.P. Dantas, Uso de psicotrópicos no Brasil: uma revisão da literatura, *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, **12**(4), 6-10 (2016).
26. G.A. Sarmiento, S.D. Santos, Perspectiva do usuário sobre o acompanhamento e o uso de psicotrópicos na atenção básica, *Essentia*, **20**(2), 52-60 (2019).
27. D.C. Braga, S.M. Bortolini, T.G. Pereira, R.B. Hildebrando, T.A. Conte, Uso de psicotrópicos em um município do meio oeste de Santa Catarina, *Journal of the Health Sciences Institute*, **34**(2), 108-113 (2016).
28. E. Balen, F. Giordani, M.F.F. Cano, F.H.T. Zonzini, K.A. Klein, M.H. Vieira, P.C. Mantovani, Interações medicamentosas potenciais entre medicamentos psicotrópicos dispensados, *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, **66**(3), 172-177 (2017).
29. C.A.S. Moreno, M.M.A. Castillo, R.A.B. Torres, L.G. Ocañas, Consumo de drogas médicas, medicamentos de venda livre e álcool em idosos, *Journal of Health NPEPS*, **3**(2), 583-600 (2018).
30. M.G. Oliveira, W.W. Amorim, C.R.B. Oliveira, H.L. Coqueiro, L.C. Gusmão, L.C. Passos, Brazilian consensus of potentially inappropriate medication for elderly people. *Geriatrics Gerontology and Aging*, **10**(4), 168-181 (2016).
31. D.C. Marini, M.E. Turatti, Estudo das interações medicamentosas em um consultório psiquiátrico de Mogi Guaçu, *FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas*, **5**(7), 11-30 (2014).
32. C.L. Ferreira Júnior, S.R.S. Seixas, C.S.S. Cruz, M.L.P. Pinheiro, Análise das interações medicamentosas em prescrições de psicotrópicos de pacientes de um município de Minas Gerais e fatores relacionados, *Brazilian Journal of Development*, **7**(12), 120372-120385 (2021).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

A.G. Caminha de Sousa, L.K.D. Barroso, M.E. da Silva-Menezes, F. de Sousa-Oliveira, Análise das prescrições de psicofármacos de uma farmácia básica em um município do Curimataú Paraibano (Brasil), *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 796-815 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.107052>

# Determination of bacterial endotoxins in normal intravenous human immunoglobulin on the replacement of rabbit pyrogen testing in Brazil

Alessandra Vidal Pereira\*, Hendro Freitas de Farias, Fernando Faria Fíngula, Sheila Regina Gomes Albertino, Lilia Serodio

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*Corresponding author E-mail: [lilia.serodio@gmail.com](mailto:lilia.serodio@gmail.com)

Received: December 22, 2022

Corrected: March 28, 2023

Accepted: April 3, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** The normal intravenous human immunoglobulin is a sterile liquid or lyophilized preparation, with immunoglobulins, especially the immunoglobulin G (IgG). The National Institute for Quality Control in Health (NIQCH) performs analysis of biological products before being distributed to the population. The batches are subjected to physicochemical and biosafety assays. The rabbit pyrogen test (RPT) is a biosafety assay performed to check the contamination by agents that cause fever in the patient and, in cases of high concentration, can lead to death. **Aim:** To compare the results of RPT and bacterial endotoxins assays of ten samples. **Methods:** In RPT, both the product is injected into the rabbit's marginal ear vein and the individual body temperature variations of the animals are evaluated. The bacterial endotoxin assay uses the kinetic chromogenic method, according to the Brazilian Pharmacopoeia and the international compendiums. **Results:** The tests of were plotted in a table for comparison. The tests coincided in 9 samples, except for a sample that presented bacterial endotoxin pyrogenicity. **Conclusion:** Bacterial endotoxin assay must be considered as an alternative method for animal tests.

**Keywords:** Normal human immunoglobulin, pyrogen, bacterial endotoxin.



## RESUMEN

### Determinación de endotoxinas bacterianas en inmunoglobulina humana intravenosa normal en reemplazo de la prueba de pirógenos de conejo en Brasil

**Introducción:** la inmunoglobulina humana intravenosa normal es una preparación líquida o liofilizada estéril, con inmunoglobulinas, especialmente la inmunoglobulina G (IgG). El Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud (INCQS) realiza análisis de productos biológicos antes de ser distribuidos a la población. Los lotes se someten a ensayos fisicoquímicos y de bioseguridad. La prueba de pirógenos en conejo (RPT) es un ensayo de bioseguridad que se realiza para verificar la contaminación por agentes que causan fiebre en el paciente y, en casos de alta concentración, pueden causar la muerte. **Objetivo:** comparar los resultados de los ensayos de RPT y endotoxinas bacterianas de diez muestras. **Métodos:** en RPT, el producto se inyecta en la vena marginal de la oreja del conejo y se evalúan las variaciones de temperatura corporal individual de los animales. El ensayo de endotoxinas bacterianas utiliza el método cromogénico cinético, de acuerdo con la Farmacopea Brasileña y los compendios internacionales. **Resultados:** las pruebas de se trazaron en una tabla para comparación. Las pruebas coincidieron en 9 muestras, excepto en una muestra que presentó pirogenicidad de endotoxina bacteriana. **Conclusión:** el ensayo de endotoxinas bacterianas debe considerarse como un método alternativo para las pruebas en animales.

**Palabras clave:** Inmunoglobulina humana normal, pirógeno, endotoxina bacteriana.

## RESUMO

### Determinação de endotoxinas bacterianas em imunoglobulina humana intravenosa normal em substituição ao teste de pirogênio em coelhos no Brasil

**Introdução:** a imunoglobulina humana intravenosa normal é uma preparação líquida estéril ou liofilizada, com imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (IgG). O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) realiza análises de produtos biológicos antes de serem distribuídos à população. Os lotes são submetidos a ensaios físico-químicos e de segurança. O teste de pirogênio em coelhos (RPT) é um ensaio de segurança realizado para verificar a contaminação por agentes

que causam febre no paciente e, em casos de alta concentração, podem levar ao óbito.

**Objetivo:** comparar os resultados dos ensaios de RPT e endotoxinas bacterianas de onze amostras. **Métodos:** no RPT, o produto é injetado na veia marginal da orelha do coelho, e as variações de temperatura corporal individual dos animais são avaliadas. O ensaio de endotoxina bacteriana utiliza o método cromogênico cinético, de acordo com a Farmacopéia Brasileira e os compêndios internacionais. **Resultados:** os resultados dos ensaios foram plotados em uma tabela para comparação. Os testes coincidiram em 9 amostras, com exceção de 2 amostra que foram discrepantes na comparação entre os dois ensaios. **Conclusão:** o ensaio de endotoxina bacteriana deve ser considerado como um método alternativo para testes em animais.

**Palavras-chave:** Imunoglobulina humana normal, pirogênio, endotoxina bacteriana.

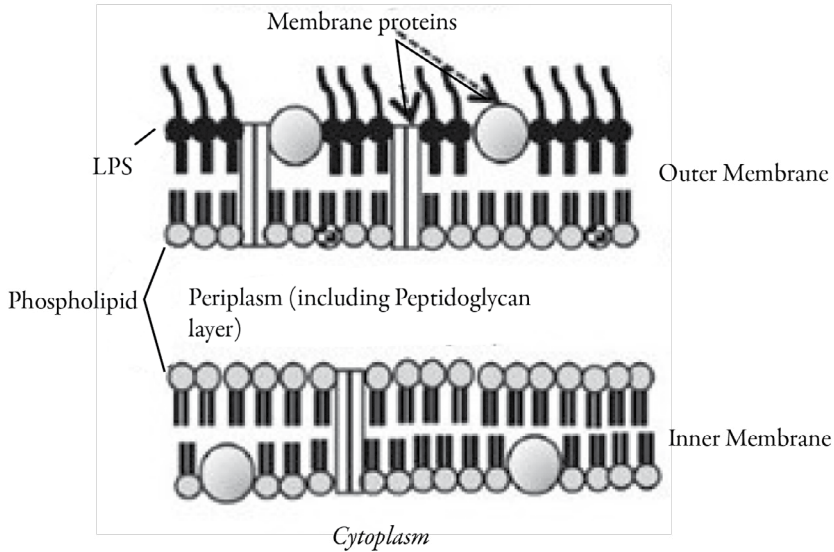
## INTRODUCTION

The normal intravenous human immunoglobulin is a sterile liquid or lyophilized, with immunoglobulins, especially immunoglobulin G (IgG) of normal individuals [1, 2].

The production method includes one or several steps that eliminate or inactivate the known infection agents. It should show that the residues in the final product of the substances used in the processes aimed at inactivating the virus do not have any adverse reaction in the patients treated with immunoglobulin [1, 2].

The safety immunoglobulin assays in Brazil are sterility and RPT. However, the European Pharmacopoeia admits bacterial endotoxin assay as an alternative test to the *in vitro* method [2].

Parenteral preparations have to be pyrogen-free because the administration of pyrogens may induce fever, shock, or even death. This safety test is extremely important, because immunoglobulin is used for the treatment of individuals with significant comorbidities such as primary immunodeficiency as well as a number of neurological indications, including chronic inflammatory demyelinating, polyneuropathy, and idiopathic thrombocytopenic purpura, especially in impaired individuals who had received intravenous human immunoglobulin [3, 4]. Endotoxins represent the lipopolysaccharides (LPS) of the cell wall of Gram-negative bacteria (Figure 1).



**Figure 1.** The outer membrane of the Gram-negative cell envelop. Source: McCullough (2019) [4].

Because endotoxins are the most common and potent pyrogens, the LAL testing has successfully replaced the rabbit pyrogen test for many products [5].

Each batch of human immunoglobulin is sent for evaluation at the National Institute for Quality Control in Health (NIQCH), Fiocruz, where biological safety tests are carried out [6].

The *in vivo* pyrogen assay involves raising the temperature of rabbits after intravenous injection of a test solution into the ear vein. In Brazil, the pyrogen test in human immunoglobulin is performed according to the Brazilian Pharmacopoeia, and the recommended injection volume is 1 mL/kg of body weight [1].

Although the European Pharmacopoeia already recommends the alternative *in vitro* bacterial endotoxin method, the assay is not yet recommended in the Brazilian Pharmacopoeia as an alternative to the rabbit pyrogen assay in normal human immunoglobulin [1].

In NIQCH, the Kinetic Chromogenic LAL Assay is used, which is a quantitative kinetic assay for the detection of Gram-negative bacterial endotoxin. An endotoxin catalyzes the activation of a proenzyme in the LAL. The initial activation rate depends

on the concentration of the endotoxin. Endotoxin turns a proenzyme into an active enzyme. The enzyme para-nitroanillin (pNA) release produces a yellow color, which is measured photometrically at 405 nm. The intensity of the color corresponds to the activity of endotoxin present in the system [7].

The concentration of unknown samples can then be calculated from a standard curve. It is the chromogenic nature of the Kinetic Chromogenic LAL Assay that makes it the most appropriate choice for testing small volume parenteral solutions, vaccines, antibiotics, and biologicals [8].

This work was aimed at comparing the pyrogenic assays in rabbits and bacterial endotoxins in the immunoglobulins received by the NIQCH.

## METHODOLOGY

To assess the sensitivity of animals at the threshold dose that causes fever in rabbits and humans, periodic dose-response curves are performed using standard *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) solution at non-pyrogenic (0.5 ng/mL), limit (1 ng/mL) and pyrogenic (2 ng/mL) concentrations. In the *in vivo* pyrogen assay, the product is injected into the marginal vein of the ear of three rabbits with a volume of 1 mL/kg, and the individual variations in body temperature of the animals are evaluated. In order for the product to be considered satisfactory, no animal can have a temperature variation equal to or greater than 0.5 °C. If this occurs, a retest is performed using five new rabbits. In this case, out of a total of eight animals, only three can have a temperature variation equal to or greater than 0.5 °C and the sum of the temperatures cannot exceed 3.3 °C. If any of the cases occurs, the product is considered pyrogenic.

The tests on rabbits were authorized by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Foundation, license LW-1/23.

Before LAL assay the Maximum Valid Dilution (MVD) was determined in dilutions 1:50, 1:80 e 1:100 to verify the interference-free dilution, according to the equation [9]:

$$\text{MVD} = \text{Control Standard Endotoxin} / \text{the lowest point used in the standard curve}$$
  
the bacterial endotoxin assay; the Lonza Bioscience kit was used. The Kinetic-QCL™ Kinetic Chromogenic LAL Assay is a quantitative kinetic assay used to detect Gram-negative bacterial endotoxin. A sample is mixed with the reconstituted LAL reagent in a 96-well plate and placed in an incubating plate reader that measures absorbance at 405 nm. The reaction is automatically monitored over time for the appearance of a yellow color.

In the presence of endotoxin, the lysate will begin to cleave the chromogenic substrate, causing the solution to become yellow. The concentration of unknown samples can then be calculated from a standard curve and the Kinetic-QCL™ Assay with a sensitivity of 0.005 EU/mL. The assay requires the use of a standard endotoxin termed “positive product control” (PPC), which is a known amount of endotoxin mixed with a test material to confirm the absence of interference, and the endotoxin recovery in positive control (%PPC Recovery) is within the range of 50% to 200%. The maximum specification of bacterial endotoxin considered was inferior to 0.5 EU/mL of immunoglobulin, according to the European Pharmacopoeia [2]. Labeled sensitivity  $\lambda$  was confirmed by using 4 replicates expressed in EU/mL of the lysate reagent before to use in the test. This confirmation was carried out for each lysate batch before being used in the test and this is carried out when the investigators use the batch of lysate for the first time.

## RESULTS AND DISCUSSION

The MDV resulted in a 1:100 dilution, however, we chose to test in lower dilutions, as using the maximum dilution is not routine in our laboratory, where we could run the risk of not detecting endotoxin in the highly diluted sample.

**Table 1.** Determination of the Maximum Valid Dilution in two batches

Batch	Dilution	Specification (EU/mL)	Result (EU/mL)	%PPC recovery
1	1:100	< 0.5	< 0.500	68%
	1:80		0.283	140%
	1:50		< 0.500	26%
2	1:100	< 0.5	0.375	119%
	1:80		< 0.400	106%
	1:50		< 0.500	30%

The two dilutions 1:80 and 1:100 resulted in a %PPC recovery, showing the absence of interferents. Therefore, we chose to use the 1:80 dilution for all batches. Table 2 shows that, out of a total of 11 samples analyzed, 3 batches were retested in more 5 rabbits and one batch showed fail result, coinciding with the endotoxin assay. However, one sample only failed in the endotoxin assay and the rabbit pyrogen test was negative for the pyrogenic substance. The sample 11 failed in the first pyrogen test on

rabbit and was satisfactory in the retest requested by the distributor. The endotoxin assay was satisfactory from the first test (Table 2).

The pyrogen detection limit does not exceed 50-350 picograms (i.e., 0.5-3.5 EU) of lipopolysaccharide per rabbit kg [10].

The rabbit pyrogen test was studied in the context of the importance of alternatives that could contribute towards its replacement. There are three broad categories of bioassays which are commonly used for biological products: binding assays, cell-based assays, and whole animal assays. These assays can be more variable than binding assays and must be performed carefully to ensure consistent results. Whole animal assays are time consuming and highly variable. These assays are used for pyrogen assays, general safety assays, and potency assays. Binding assays typically have coefficient of variation (CV) in the 5 to 20 % range. Cell and whole animal assays may have variability above 50% [11]. In our tests, a CV of 10% is used.

**Table 2.** Results from ten human immunoglobulins (HIG) batches evaluated in the rabbit pyrogen and in the endotoxin (LAL) assays.

HIG batch	Rabbit pyrogen test		Endotoxin	
	Total temperature	Number of rabbits	EU/mL	% PPC Recovery
1	Passed (0.65 °C)	3	< 0.400	124%
2	Passed (0.27 °C)	3	0.283	140%
3	Passed (0.45 °C)	3	0.284	175%
4	Passed (0.17 °C)	3	< 0.400	153%
5	Passed (0.19 °C)	3	< 0.400	170%
6	Passed (0.33 °C)	3	< 0.400	117%
7	Passed (0.56 °C)	3	Fail 0.634	136%
8	Passed (0.16 °C)	3	< 0.400	117%
9	Fail (6.37 °C)	8	Fail 39.6	200%
10	Passed (2.09 °C)	8	< 0.400	90%
11	Fail (3,65 °C)	8	< 0.400	106%
11*	Passed (2.72 °C)	8	NR	NR

\* Retest requested by the distributor NR – No Retest

The 3Rs – Replacement, reduction and refinement - concept has become a standard in legislation and guidelines concerning animal experimentation in many countries. Replacement involves the replacement of an *in vivo* assay with relevant non-ani-

mal-based methods. The use of biological products must comply with the pyrogen test, according to the regulatory standards of each country. It is a qualitative test in animals, which verifies the absence or presence of contaminants. Among the most relevant factors that can interfere with the final result of *in vivo* tests are the temperature and exhaustion of the test room, sensitivity, infections by microorganisms, and the diet of the animals [12, 13]. The substitution of *in vivo* methods with non-animal assays for the quality control and batch release testing of biological products is already being introduced and recognized by some regulatory authorities [8]. Each monograph needs to be examined individually to verify whether the pyrogen test can be replaced either by the LAL test or by an *in vitro* pyrogen test. The European Pharmacopoeia has set up a Group of Experts to develop *in vitro* alternative tests for pyrogen testing. It is foreseen that when a validated in-vitro pyrogen test is available, it will be included in the European Pharmacopoeia together with appropriate guidelines for validating the *in vitro* for pyrogenic substances assays as a replacement of the pyrogen test [14].

The production process of biological products must be aimed at obtaining products of quality, safety, and efficacy. The processes used must comply with a quality assurance system and Good Manufacturing Practices (GMP) and, therefore, monitoring is necessary during the production stages, including obtaining water, reagents, and containers used for collecting blood, plasma, formulation, and final packaging. Therefore, if all measures to detect the critical steps in obtaining the products are applied, it could significantly reduce the probability of introducing agents that generate pyrogenic contamination [15].

In Brazil, the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) published a Normative Resolution in 2016, recognizing the bacterial endotoxin assay to evaluate the pyrogenic contamination in injectable products [16].

Currently, the NIQCH receives approximately 700 batches of normal human immunoglobulin for tests per year, which requires at least 4,200 rabbits, including manufacturers, to perform the pyrogen test.

## CONCLUSION

A wide range of animals is used for the manufacture or quality control of biological products. The National Institute of Quality Control in Health presented criteria to use bacterial endotoxin assay as an alternative method for the use of the rabbit pyrogen test in determining the pyrogen substances in order to comply with the CONCEA in the substitution of animals according to the 3 Rs. The Brazilian Pharmacopoeia should be

updated, as the use of rabbits for pyrogen substance identification will be prohibited in the end of 2024. Both methods (LAL test and RPT) used for endotoxin detection can be applied for various biological products including therapeutic proteins, vaccines, and other biological products. However, the LAL test is more accurate, fast, economical, and sensitive than RPT. Thus, the use of the bacterial endotoxin assay would be a feasible alternative for animal test to detect pyrogenic substances in normal intravenous human immunoglobulin on the replacement of rabbit pyrogen testing.

## CONFLICT OF INTEREST

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

## REFERENCES

1. ANVISA, Farmacopéia Brasileira, 6ª edição, HD018-00, Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 298, 2019.
2. European Pharmacopoeia, Human normal immunoglobulin for intravenous administration, 2022, Vol. 10.8, p. 6929-6930.
3. C. Zervos, T.P. Zimmerman, T. Willis, G. Flexman, J. Srivastava, R. Silverstein, M. Williams, P. Vandenberg, J.L. Culp, D. Burns, V. Barham, A. Durham, D.A. Malinzak, Immunoglobulin G from single plasma donor in immune globulin intravenous causes false positive pyrogen test, *Biologicals*, **59**, 12-19 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.04.001>
4. K.Z. McCullough, "Fit for purpose" endotoxin analytes, *American Pharmaceutical Review*, 2019. URL: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/557587-Fit-For-Purpose-Endotoxin-Analytes/>
5. European Medicines Agency, *Guideline on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products*, 2009. p. 1-6.
6. ANVISA, Resolução RDC nº 73 de 21/10/2008.
7. S. Iwanaga, Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **83**(4), 110-119 (2007). Doi: <https://doi.org/10.2183/pjab.83.110>
8. M. Halder, Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals, *ALTEX*, **18**(Suppl 1), 13-47 (2001).



9. Food and Drug Administration – FDA, *Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices*, 1987
10. M.A. Elkhateeb, W. Elkhatib, M. Aboulwafa, An expert review on current approaches for endotoxin detection in various biological products, *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*, 3(2), 142-153 (2019). Doi: <https://doi.org/10.21608/APS.2019.13058.1000>
11. World Health Organization, A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation, 1997.
12. P. Castle, Alternatives to animal testing: Achievements and recent developments in the European Pharmacopoeia, *Developments in Biological Standardization*, 86, 21-29 (1996).
13. T. Hartung, I. Aaberge, S. Berthold, G. Carlin, E. Charton, S. Coecke, S. Fenrich, M. Fischer, M. Gommer, M. Halder, K. Haslov, M. Jahnke, T. Montag-Lessing, S. Poole, L. Schechtman, A. Wendel, G. Werner-Felmayer, Novel pyrogen tests based on the human fever reaction: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43. European Centre for the Validation of Alternative Methods. European Centre for the Validation of Alternative Methods, *Alternatives to Laboratory Animals*, 29(2), 99-123 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1177/0261192901029002>
14. E. Charton, P. Castle, Reduction, replacement and refinement of animal tests in the European Pharmacopoeia: Recent developments for monographs on biological substances and preparations, *PHARMEUROPA*, 13(1), 94-96 (2001).
15. ANVISA, Resolução RDC nº 658, 30 de março de 2022.
16. CONCEA, Resolução Normativa no 31, 18 de agosto de 2016.

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

A. Vidal-Pereira, H. Freitas de Farias, F. Faria-Fíngula, S.R. Gomes-Albertino, L. Sero-dio, Determination of bacterial endotoxins in normal intravenous human immunoglobulin on the replacement of rabbit pyrogen testing in Brazil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, 52(2), 816-825(2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106516>

# Study to determine the regenerative activity of tincture of *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) and *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) in an experimental model using *Escherichia coli* cultures

Evelise Camila Primon, Susana Beatriz da Rocha, Renan Marcel Bonilha Dezena\*, Gustavo Henrique da Silva

Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas), Center for Life Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Campinas, SP, Brazil.

\*Corresponding author E-mail: [renan\\_marcel@hotmail.com](mailto:renan_marcel@hotmail.com)

Received: December 7, 2022

Corrected: April 20, 2023

Accepted: April 27, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** The induction of bacterial growth, in the experimental design used, was proposed as a strategy for evaluating the regeneration of epithelial tissue through the production of extracellular matrix by the fibroblast, collaborating with the healing process, in addition to inducing the production of glycocalyx in epithelial cells, facilitating adhesion and migration to recover the injured region. **Aim:** To determine the action of the tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* on the growth of *Escherichia coli* cultures, to simulate, in this type of model, the potential regenerative activity of connective and epithelial cells, especially the fibroblast, by means of the disk-diffusion and spectrophotometric. **Results:** The tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* at high and medium concentrations (above 1.6%) inhibit the development of *Escherichia coli* in culture, but at low concentrations (from 0.4 to 1.6%) induce bacterial proliferation, especially in the case of *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* tinctures.

**Keywords:** *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia*, *Casearia sylvestris*, *Escherichia coli*, spectrophotometric.

## RESUMO

Estudo para determinar a atividade regenerativa da tintura de *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) e *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) em modelo experimental utilizando culturas de *Escherichia coli*

**Introdução:** a indução do crescimento bacteriano, no delineamento experimental utilizado, foi proposta como estratégia para avaliar a regeneração do tecido epitelial por meio da produção de matriz extracelular pelo fibroblasto, colaborando com o processo de cicatrização, além de induzir a produção de glicocálix nas células epiteliais, facilitando a adesão e migração para recuperação da região lesada. **Objetivo:** determinar a ação das tinturas de *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* e *Casearia sylvestris* sobre o crescimento de culturas de *Escherichia coli*, a fim de simular, neste tipo de modelo, a potencial atividade regenerativa de células conjuntivas e epiteliais, especialmente fibroblasto, por meio do disco-difusão e espectrofotometria. **Conclusão:** as tinturas de *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* e *Casearia sylvestris* em altas e médias concentrações (acima de 1,6%) inibem o desenvolvimento de *Escherichia coli* em cultura, mas em baixas concentrações (de 0,4 a 1,6%) induzem a proliferação bacteriana, principalmente no caso das tinturas de *Maytenus ilicifolia* e *Casearia sylvestris*.

**Palavras-chave:** *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia*, *Casearia sylvestris*, *Escherichia coli*, espectrofotometria.

## RESUMEN

Estudio para determinar la actividad regeneradora de la tintura de *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) y *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) en un modelo experimental utilizando cultivos de *Escherichia coli*

**Introducción:** la inducción del crecimiento bacteriano, en el diseño experimental utilizado, se propuso como estrategia para evaluar la regeneración del tejido epitelial a través de la producción de matriz extracelular por parte del fibroblasto, colaborando con el proceso de cicatrización, además de inducir la producción de glicocálix en las células epiteliales, facilitando la adhesión y migración para la recuperación de la región lesionada. **Objetivo:** determinar la acción de las tinturas de *Hamamelis*

*virginiana*, *Maytenus ilicifolia* y *Casearia sylvestris* sobre el crecimiento de cultivos de *Escherichia coli*, con el fin de simular, en este tipo de modelo, la potencial actividad regeneradora de células conectivas y epiteliales, especialmente fibroblastos por medio de disco-difusión y espectrofotometría. **Resultados:** las tinturas de *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* y *Casearia sylvestris* en concentraciones altas y medias (superiores a 1,6 %) inhiben el desarrollo de *Escherichia coli* en cultivo, pero en concentraciones bajas (de 0,4 a 1,6 %) inducen la proliferación bacteriana, especialmente en el caso de las tinturas de *Maytenus ilicifolia* y *Casearia sylvestris*.

**Palabras clave:** *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia*, *Casearia sylvestris*, *Escherichia coli*, espectrofotometría.

## INTRODUCTION

The history of herbal medicine began centuries ago through empirical knowledge in which, through observation of the behavior of animals in relation to the ingestion of this or that vegetable, it was possible to understand the useful or harmful properties of medicinal plants; they are part of human evolution and were the first therapeutic resources used by generations [1-3]. Ancient civilizations have their own historical references about medicinal plants and, long before any form of writing appeared, man already used plants and, among these, some as food and others as medicine [4, 5].

The *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae) is a small tree or deciduous and branched shrub native to the United States and Canada bearing the name, *Virginiana* which refers to the place in the United States where it was found, it was also introduced in England and later throughout Europe [6, 7]. Due to the presence of tannins, proteins precipitate from the surface cells of the mucosa and tissues, forming a protective coating, reducing the formation of secretions and protecting against infections; in addition, it has anti-inflammatory and antioxidant action and is associated with the presence of flavonoids [8, 9].

The *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) has been known for many years by the Indians, it has this name for the appearance of its leaves, which have thorns on the edges, being originally from Brazil, found in the regions of Minas Gerais to Rio Grande do Sul, being more found in the south of Paraná [10, 11].

It has a toning action that is obtained due to the reintegration of the stomach effects that it promotes, it has a potent anti-gastric ulcer effect due to the action of the tannins present in its structure that increases the pH and volume of the gastric content, also promoting a healing effect on the ulcer [12, 13].

The *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), widely used for years by the natives as an antidote for snakebite, is a Brazilian plant found in almost all territory, and the parts used for therapeutic purposes are the leaves and the stem bark [14]. It has cytoprotective activity that acts on all levels of ulcerations, thus contributing mainly to the healing of gastrointestinal ulcers [15, 16].

In skin wounds, there are stimuli for the migration and proliferation of cells (fibroblasts, epithelial cells, and keratinocytes) from their margins, the basal cells close to the wound region, when they lose interaction with adjacent cells, are activated, acquire mitotic properties and proliferate towards the center of the lesion [17].

Even when the wound space is filled with granulation tissue, the margins move towards each other due to the differentiation of some fibroblasts from the wound margins to myofibroblasts, therefore, to fibroblasts with contractile capacity [18].

Among the growth factors, those that seem to have more prominence in wound healing are the fibroblast growth factors (FGF), with the basic reaction FGF (FGF $\beta$ ) exerting a greater number of physiological reactions [19, 20]. The main sources of these cytokines are macrophages, lymphocytes, and platelets [21, 22].

This study aimed to determine the action of the tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* on the growth of *Escherichia coli* cultures, in order to simulate, in this type of model, the potential regenerative activity of connective and epithelial cells, especially the fibroblast, by means of the disk-diffusion and spectrophotometric.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant Samples

Samples of *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) and *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) were obtained through the acquisition from the company Ely Martins.

All characterization and identification were performed in the pharmacognosy laboratory of the Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-CAMPINAS).

### Agar Diffusion Method

First, dilutions were made in sterile water of the glycolic tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* in the following dilutions: 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56 %, 0.8% and 0.4%, according to Table 1.

**Table 1.** Dilutions of alcoholic tinctures of medicinal plants.

Concentration (%) of Alcoholic Tinctures	Amount in (mL) of Alcoholic Tinctures of Medicinal Plants	Amount in (mL) of distilled water
100	5	-
50	2.5	2.5
25	1.25	3.75
12.5	0.625	4.375
6.25	0.3125	4.6875
3.125	0.15625	4.8437
1.5625	0.07812	4.9218
0.78125	0.03906	4.9609
0.390625	0.01953	4.9804

The application of the diffusion method is limited to fast-growing microorganisms, whether aerobic or facultative anaerobes. The microorganism used was *Escherichia coli*, which takes the form of a bacillus and belongs to the Enterobacteriaceae family. They are facultative aerobic and anaerobic. Its natural habitat is the intestinal lumen of humans and other warm-blooded animals. It has multiple flagella arranged around the cell.

Three well-isolated colonies of the same morphological type as the agar plate were selected.

The surface of each colony was touched with a loop, and the microorganisms transferred to a tube containing 4-5 mL of a suitable culture medium, such as tryptic soy broth. It was incubated in broth at 35 °C until reaching or exceeding the turbidity of a standard 0,5 MacFarland solution for 6 hours.

After 6 hours, the growing culture was adjusted to turbidity with sterile saline compatible with that of the 0,5 MacFarland standard solution.

This resulted in a suspension containing approximately 1 to  $2 \times 10^8$  CFU/mL of *Escherichia coli* ATCC® 25922. It was necessary to perform a reading with a spectrophotometer at this stage so that the turbidity adjustment is within the MacFarland scale standards 0,5.

On each plate add 20 mL of the molten culture medium. Promote smooth homogenization with figure-eight movements. Allow to solidify in a homogeneous and smooth layer.

Under ideal conditions, a sterile cotton swab was dipped into the suspension for 15 minutes after adjusting the turbidity of the inoculum suspension. The swab was rotated several times and pressed firmly against the tube wall above the liquid level to remove excess inoculum on the swab.

The dry surface of the TSA plate was inoculated by rubbing the swab across the entire sterile surface, rubbing twice more, rotating approximately 60° each time, and finally swabbing the edge of the agar plate, ensuring uniform distribution of the inoculum.

Recommended inoculation conditions are 35-37 °C temperature for bacteria for 24 hours to 48 hours. As a variation of the method, the petri dishes were incubated for 14 h at 37 °C, and at the end of this time, the inhibition halos were measured, in millimeters, with the aid of a caliper ruler.

For the application of the tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris*, in the perforated disks of the plate deposited on the solidified culture medium containing the bacterial inoculum, an automatic pipette was used, applying 100 µg/mL of the tinctures (and their dilutions in decreasing concentrations) in each hole. The technique was performed in a sterilized medium close to a Bunsen burner. At least three plates were prepared for each standard concentration.

#### **Technique for spectrophotometric determination of bacterial growth in broth**

To prove the results obtained by the disk-diffusion technique, the broth dilution method was also performed. This method considers the relationship between the proportion of growth of the challenged microorganism in the liquid medium and the concentration of the substance tested. The evaluation is compared against a biological reference standard, in this work the inert culture medium was used. During the conduction of the method, 10.36 g was dissolved in distilled water, completing the volume to 280 mL according to the manufacturer's instructions, with volumes of 5 mL in test tubes sterilized in an autoclave at 121 °C/15 minutes. For the preparation of the microorganism on the MacFarland 0,5 scale, three colonies, well isolated, of the same morphological type of the agar plate were selected.

The surface of each colony was touched with a loop, and the microorganisms transferred to a tube containing 4-5 mL of a suitable culture medium, such as tryptic soy broth. It was incubated in broth at 35 °C until reaching or exceeding the turbidity of a standard 0,5 MacFarland solution for 6 hours. After 6 hours, the growing culture was adjusted to turbidity with sterile saline compatible with that of the 0,5 MacFarland standard solution. This resulted in a suspension containing approximately 1 to 2 × 10<sup>8</sup> CFU/mL of *Escherichia coli* ATCC® 25922. It was necessary to perform a reading with a

spectrophotometer at this stage so that the turbidity adjustment is within the MacFarland scale standards 0,5.

After 24 hours, the test tubes were inoculated, where 54 test tubes were used, the test was performed in triplicate, to obtain more accurate results. To the previously prepared BHI broth, 100 µg/mL were added with an automatic and sterile pipette of the alcoholic tincture of the plant in each test tube, previously diluted in decreasing concentrations. This step was repeated for the three alcoholic tinctures under study.

Under ideal conditions, 100 µg/mL was added with an automatic and sterile pipette of the microorganism previously prepared within the 0,5 MacFarland scale standards in all tubes, except for the blank sample, while for the negative control, culture medium is used with the solvent used to dissolve the sample and the microbial suspension.

The technique was performed in a sterilized medium close to the Bunsen burner, after inoculation of the bacteria in the test tubes, they were properly closed with a lid to avoid contamination. The test tubes were incubated at 35-37 °C for approximately 24 hours. At the end of this time, it is understood that by proportion the turbidity density was caused by microbial growth.

Quantitative analysis was performed using the spectrophotometric technique, at a wavelength of 625 nm. The reading was performed in all test tubes, containing the alcoholic tinctures in their different concentrations, being used for calibration the sample containing the culture medium and the microorganism studied. The method provides quantitative results and is not influenced by the growth rate of microorganisms.

### **Statistical Analysis**

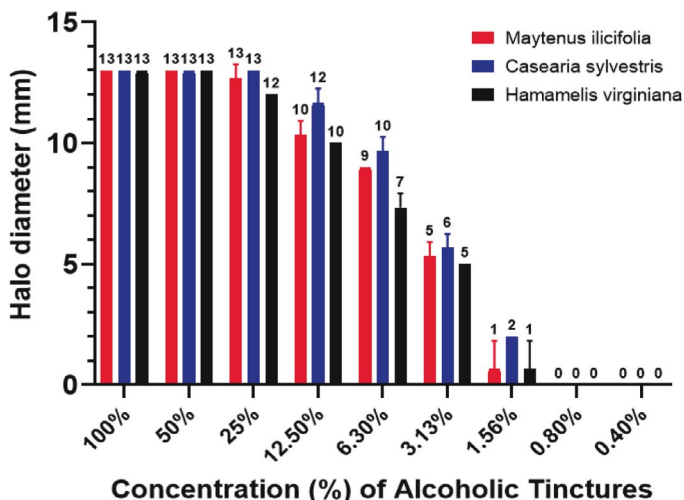
The results obtained were analyzed statistically using the Prism 3.0 software using analysis of variance and variance (ANOVA with repetition of measures) followed by Tukey's test, with differences considered significant with  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Disk diffusion method in TSA**

The plates were satisfactorily seeded, and the inoculum was correct and showed uniformly circular inhibition halos and a confluent growth mat. The diameters of the halos were measured including the diameter of the disc, calculated the diameter of the halos with a ruler, leaning against the back of the inverted petri dish with reflected light. Figure 1 shows the diameter of the inhibition halos for each dilution of the studied tinctures.



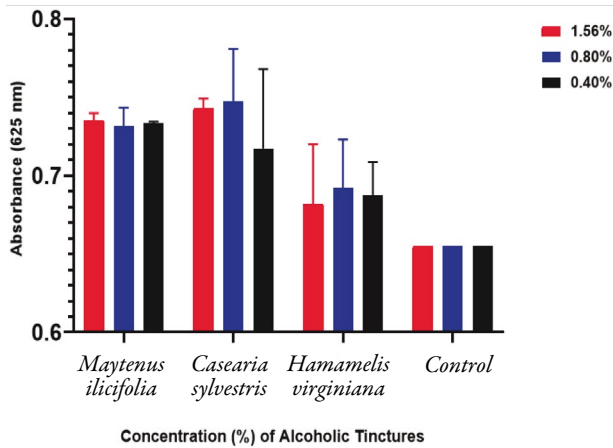


**Figure 1.** Mean diameter of inhibition zones (mm) of *Escherichia coli* growth under the addition of tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* in decreasing concentrations. The analysis of variance (ANOVA with repetition of measures) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the groups, and the Tukey test indicated a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* groups and between *Maytenus ilicifolia* and *Hamamelis virginiana*.

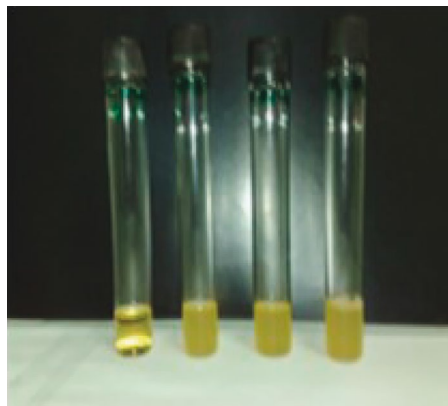
As shown in Figure 1, it was observed that in the holes in the plate where the tinctures in low concentration were placed, there was an increase in the proliferation of *Escherichia coli* colonies, which indicates that the tinctures in high concentrations have an inhibitory action.

#### Technique for Spectrophotometric Determination of Bacterial Growth in Broth

The use of this technique aimed to confirm the previous results, mainly in relation to the observation that at low concentrations there was a bacterial growth. In fact, this was verified according to the results presented in Figure 2. In the tested dilutions (less than 1.6%), there was an absorbance (turbidity), as seen in Figure 3, greater in the tubes containing low concentrations of the tinctures than in those in that there was only the culture of bacteria (control). It is also possible to observe that the tincture of which *Hamamelis virginiana* proved to be less efficient in this parameter.



**Figure 2.** Diluted BHI absorbance after growth of *Escherichia coli* under the addition of tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* in decreasing concentrations. The analysis of variance (ANOVA with repetition of measures) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the groups, and the Tukey test indicated a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the *Hamamelis virginiana* group and the *Maytenus ilicifolia* groups ( $p < 0.05$ ) and *Casearia sylvestris* ( $p < 0.001$ ).



**Figure 3.** Turbidity test showing bacterial growth.

## DISCUSSION

The method used to observe bacterial growth was initially disk-diffusion in agar, where using different dilutions of tincture of the three species studied, it was observed that

at higher concentrations the tinctures caused bacterial inhibition, however at lower concentrations bacterial growth was stimulated. The agar diffusion method is normally used to evaluate the antimicrobial activity at different concentrations with a focus on determining the minimum inhibitory concentration (MIC), however this study differs in its objective, as it was prioritized the concentration that instead of inhibiting stimulates bacterial growth.

Antiseptic activity for *Maytenus ilicifolia*, being an indication of the inhibitory potential of microorganisms when used in medium and high dilutions [23]. *Casearia sylvestris* has a well-defined inhibitory activity for fungi such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, in addition to being an important antiseptic [24-26]. In the case of *Hamamelis virginiana*, there are no reports of its use as an antiseptic or antimicrobial activity, however this was verified in the present work, although with a more discreet efficiency in relation to the other two tested tinctures.

As a confirmatory method of the first procedure, and aiming at better precision, the spectrophotometric technique was used to determine bacterial growth in broth, confirming and detailing the results presented in disk-diffusion, mainly regarding the stimulation of bacterial growth, which was observed in an imprecise way in the first technique. In the tested dilutions (less than 1.6%), there was a higher absorbance (turbidity) in the tubes containing low concentrations of the tinctures than in those in which there was only the bacterial culture (control). It is also possible to observe that the tincture of which *Hamamelis virginiana* proved to be less efficient in this parameter.

For bacterial proliferation it is necessary: (A) increase in ribosomal activity as these correspond to the site of protein synthesis [27]. Protein synthesis involves a complex cycle in which various ribosomal components play specific roles [27]; the ribosome can be interpreted as a dynamic structure, which interacts with many other cellular proteins [27]; (B) production of glycocalyx as the bacteria adhere to each other and to the substrate through protein-protein interactions present on the surface of the pathogen and host cells [28]. Furthermore, as the outer polysaccharide layers are likely to be associated with significant amounts of water, it is believed that the glycocalyx may confer some resistance to desiccation [29].

In the above perspective, there is a similarity between bacterial growth and fibroblast proliferation in a regenerative process, since these cells undergo phenotypic changes from migrating and replicating immature cells at the beginning of the process to cells actively engaged in protein synthesis, that is, its cytoplasm becomes voluminous and presents a rough endoplasmic reticulum with abundant ribosomes. As a result, they begin to secrete large amounts of collagen. It gradually replaces proteoglycans and fibronectin until it becomes the main component of the scar being formed [30].

In addition, with regard to the glycocalyx in epithelial cells, it represents an integral part of the cell membrane, which plays an important role in different forms of cellular interaction, such as, for example, cell adhesion processes, lymphocyte circulation and other signaling processes recognition, since glycocalyx frequently intervenes in the formation of receptors on the cell surface [31, 32].

The results obtained with the tincture of *Hamamelis virginiana* are in agreement with the scientific literature since isolated fractions of the tinctures of this plant stimulate and increase the proliferation of keratinocytes in epidermal cell culture [33, 34].

Similarly, the results obtained for the tincture of *Maytenus ilicifolia* corroborate reports in the literature that this plant accelerates the healing of peptic ulcers, and in comparative models with cimetidine, who ingested the *Maytenus ilicifolia* tinctures had their lesions healed earlier [35-37]. For *Casearia sylvestris*, whose hypothesis below led to the development of this experimental design, there are reports that its active components stimulate the proliferation of fibroblasts, intensifying the healing process, and these data are indirectly in agreement with the results obtained in the present study for the tincture of this species [38, 39].

## CONCLUSION

According to the results obtained in this study, it is concluded that the tinctures of *Hamamelis virginiana*, *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* at high and medium concentrations (above 1.6%) inhibit the development of *Escherichia coli* in culture, but at low concentrations (from 0.4 to 1.6%) induce bacterial proliferation, especially in the case of *Maytenus ilicifolia* and *Casearia sylvestris* tinctures.

The induction of bacterial growth, in the experimental design used, is a strong indication that these tinctures, if used in regenerating epithelial tissue, stimulate the production of extracellular matrix by the fibroblast, collaborating in the healing process, as well as inducing the production of glycocalyx in the epithelial cells facilitating adhesion and migration of these for recovery of the injured region.

Evidently, the present work is a simulation, but its results corroborate the existing scientific literature on the subject, which brings relevance to the results.

Finally, it is evaluated that the methodology used allowed the proposed objectives to be met, highlighting as positive points the ease of method development, the low cost and contribution to the rationalization in the use of animals. As an unfavorable point, the results are not directly applicable to animals, requiring an *in vivo* test to ensure efficacy and safety.

## CONFLICT OF INTEREST

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

## REFERENCES

1. M.A. Potenza, M. Montagnani, L. Santacroce, I.A. Charitos, L. Bottalico, Ancient herbal therapy: A brief history of *Panax ginseng*, *J. Ginseng Res.*, **47**(3), 359-365 (2023).
2. H.M. Amer, A.A. Mohammad, Medicinal plants and their validation challenges in traditional Egyptian medicine, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **12**(3), 023-033 (2022).
3. A.B. Mekonnen, A.S. Mohammed, A.K. Tefera, Ethnobotanical study of traditional medicinal plants used to treat human and animal diseases in Sedie Muja District, South Gondar, Ethiopia, *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **2022**, 7328613 (2022).
4. M. Simbar, S. Nazarpour, F. Mojab, F.K. Badr, M. Khorrami, Z.J. Torkamani, H. Alavi-Majd, A comparative study on the effects of “honey and fenugreek” with “fenugreek” on the breastfeeding success: A randomized trial, *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **2022**, 6048280 (2022).
5. A. Sharma, P. Sabharwal, R. Dada, Herbal medicine—An introduction to its history, in: R. Henkel, A. Agarwal, *Herbal Medicine in Andrology: An Evidence-Based Update*, Academic Press, 2021. p. 1-8.
6. K.K. Solis-Arevalo, M.T. Garza-Gonzalez, H.D. Lopez-Calderon, C. Solis-Rojas, K. Arevalo-Nino, Electrospun membranes based on schizophyllan-pvoh and *Hamamelis virginiana* extract: Antimicrobial activity against microorganisms of medical importance, *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **18**(4), 522-527 (2019).
7. T.F. Abbas, M.F. Abbas, A.J. Lafta, Antibacterial activity and medical properties of Witch Hazel *Hamamelis virginiana*, *Ann. Trop. Med. Public Health*, **23**(11), 1-9 (2020).
8. M.J. Cheesman, S. Alcorn, V. Verma, I.E. Cock, An assessment of the growth inhibition profiles of *Hamamelis virginiana* L. extracts against *Streptococcus* and *Staphylococcus* spp., *J. Tradit. Complement. Med.*, **11**(5), 457-465 (2021).

9. S. Piazza, G. Martinelli, U. Vrhovsek, D. Masuero, M. Fumagalli, A. Magnavacca, C. Pozzoli, L. Canilli, M. Terno, M. Angarano, M. Dell'Agli, E. Sangiovanni, Anti-inflammatory and anti-acne effects of *Hamamelis virginiana* bark in human keratinocytes, *Antioxidants* (Basel), **11**(6), 1119 (2022).
10. C.C. Veloso, G.L. Soares, A.C. Perez, V.G. Rodrigues, F.C. Silva Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **27**, 533-540 (2017).
11. C. Hernandez, L. Miguita, R. Oliveira de Sales, E.d.P. Silva, P.O. Ribeiro de Mendonça, B. Lorencini da Silva, M.d.F.G. Klingbeil, M.B. Mathor, E.B. Rangel, L.C. Marti, J.d.S. Coppede, F.D. Nunes, A.M.S. Pereira, P. Severino, Anticancer activities of the quinone-methide triterpenes maytenin and 22- $\beta$ -hydroxymaytenin obtained from cultivated *Maytenus ilicifolia* roots associated with down-regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p, *Molecules*, **25**(3), 760 (2020).
12. N. Paulino, G.F. Vieira, M.I.d.S. Braga, L.B.d.L. Carvalho, I.P. Bernardo, V.F. Nogueira, Development of effervescent medical powder containing *Maytenus ilicifolia* extract Mart. ex Reissek for treatment of gastric disorders, *Int. J. Phyto-cosmet. Nat. Ingrid.*, **6**(1), 14 (2019).
13. G.d.C. Meirelles, S.E. Bianchi, I.R. Siqueira, V.L. Bassani, Phytochemistry and pharmaceutical technology studies on *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*): A traditionally used medicinal plant, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **32**(6), 859-870 (2022).
14. B.M. Magalhães de Oliveira, P.Z. Serpa, M.E.d.C. Zanatta, B.A. Aires, A.M. Steffler, L.B. Somensi, B.J. Cury, A.C. Dos Santos, L. Venzon, T. Boeing, L. Mota da Silva, W.A. Roman Junior, Gastroprotective and gastric healing effects of the aqueous extract of *Casearia sylvestris* in rodents: Ultrasound, histological and biochemical analyzes, *J. Ethnopharmacol.*, **298**, 115660 (2022).
15. M.N. Albano, M.R da Silveira, L.G. Danielski, D. Florentino, F. Petronilho, A.P. Piovezan, Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), *J. Ethnopharmacol.*, **147**(3), 612-617 (2013).
16. M. Lemos, J.R. Santin, C.S. Mizuno, T. Boeing, J.P. Barreto de Sousa, D. Nanayakkara, J.K. Bastos, S. Faloni de Andrade, *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **25**, 238-245 (2015).

17. R. Vu, S. Jin, P. Sun, D. Haensel, Q.H. Nguyen, M. Dragan, K. Kessenbrock, Q. Nie, X. Dai, Wound healing in aged skin exhibits systems-level alterations in cellular composition and cell-cell communication, *Cell Rep.*, **40**(5), 111155 (2022).
18. V.L. Pereira dos Santos, C.R.C. Franco, R. Wagner, C.D. Silva, G. Favretto dos Santos, R. Stafim da Cunha, A.E.M. Stingen, L.M. Monteiro, J.E. Bussade, J.M. Budel, I.J. de Messias-Reason, *In vitro* study after exposure to the aqueous extract of *Piper amalago* L. shows changes of morphology, proliferation, cytoskeleton and molecules of the extracellular matrix, *Res. Soc. Dev.*, **10**(4), e0110413289 (2021).
19. L. Hendriati, S. Kuncorojakti, T. Widodo, H.K. Meitasari, W. Prasasti, The influence of *Channa Striata* extract emulgel on incision wound healing in white rats, *Trad. Med. J.*, **24**(3), 210-215 (2019).
20. S. Barrientos, O. Stojadinovic, M.S. Golinko, H. Brem, M. Tomic-Canic. Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regener.*, **16**(5), 585-601 (2008).
21. P. Krzyszczuk, R. Schloss, A. Palmer, F. Berthiaume, The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes, *Front. Physiol.*, **9**, 419 (2018).
22. Y. Chen, H. Zhong, Y. Zhao, X. Luo, W. Gao, Role of platelet biomarkers in inflammatory response, *Biomark. Res.*, **8**, 28 (2020).
23. N. Paulino, G.F. Vieira, M.I.d.S. Braga, L.B.d.L. Carvalho, I.P. Bernardo, V.F. Nogueira, Development of effervescent medical powder containing *Maytenus ilicifolia* extract Mart. ex Reissek for treatment of gastric disorders, *Int. J. Phyto-cosmet. Nat. Ingred.*, **6**(1), 14 (2019).
24. S.K. Deshmukh, K.R. Sridhar, S. Saxena, M.K. Gupta, Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from Hill ex Schrank, in: A. Arya, K. Rusevska (editors), *Biology, Cultivation and Applications of Mushrooms*, Springer, 2022, pp. 47-116.
25. L.T.S. Domingos, F.G. Pereira, D.C. de Moraes, R. Marquete, M.E.d.N. Rocha, D.d.L. Moreira, E. Mansur, A. Ferreira-Pereira, *Casearia sylvestris* essential oil and its fractions inhibit *Candida albicans* ABC transporters related to multidrug resistance (MDR), *Rodriguésia*, **72**, e00432020 (2021).

26. A.L. dos Santos, M. Amaral, F.R. Hasegawa, J.H.G. Lago, A.G. Tempone, P. Sartorelli, (-)-T-Cadinol—a sesquiterpene isolated from *Casearia sylvestris* (Salicaceae)—Displayed *in vitro* activity and causes hyperpolarization of the membrane potential of *Trypanosoma cruzi*, *Front. Pharmacol.*, **12**, 734127 (2021).
27. D. Shore, B. Albert, Ribosome biogenesis and the cellular energy economy, *Curr. Biol.*, **32**(12), 611-617 (2022).
28. S. Kumar, C. Schmitt, O. Gorgette, M. Marbouty, M. Duchateau, Q.G. Gianetto, M. Matondo, J.-M. Guigner, H. De Reuse, Bacterial membrane vesicles as a novel strategy for extrusion of antimicrobial bismuth drug in *Helicobacter pylori*, *mBio*, **13**(5), e0163322 (2022).
29. B. Péter, E. Farkas, S. Kurunczi, Z. Szittner, S. Bősze, J.J. Ramsden, I. Szekacs, R. Horvath, Review of label-free monitoring of bacteria: From challenging practical applications to basic research perspectives, *Biosensors* (Basel), **12**(4), 188 (2022).
30. M.R. Farrell, A.J. Peregman, A.J. Vanni, The molecular profile of urethral stricture disease, in: M.D. Hofer (editor), *Scientific advances in reconstructive urology and tissue engineering*, Academic Press, 2022, p. 125-143.
31. H. Chaudhry, *The role of phosphoinositide-3 kinases and rac gtpases in vascular inflammation*, Ph. D. thesis, King's College London, 2022.
32. Z. Szittner, B. Péter, S. Kurunczi, I. Székács, R. Horvath, Functional blood cell analysis by label-free biosensors and single-cell technologies, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **308**, 102727 (2022).
33. A. Deters, A. Dauer, E. Schnetz, M. Fartasch, A. Hensel, High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: Influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin, *Phytochemistry*, **58**(6), 949-958 (2001).
34. S. Piazza, G. Martinelli, A. Magnavacca, M. Fumagalli, C. Pozzoli, M. Terno, L. Canilli, M. Angarano, N. Maranta, M. Dell'Agli, E. Sangiovanni, Unveiling the ability of Witch Hazel (*Hamamelis virginiana* L.) Bark extract to impair keratinocyte inflammatory cascade typical of atopic eczema, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(16), 9279 (2022).
35. F.B. Rosa de Moura, B.A. Ferreira, S.R. Deconte, B.C. Landim, A.B. Justino, A.A. de Aro, F.S. Espindola, R.A.F. Rodrigues, D.L. Ribeiro, F.d.A. Araújo, T.C. Tomiosso, Wound healing activity of the hydroethanolic extract of the leaves of



- Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis, *J. Tradit. Complement. Med.*, **11**(5), 446-456 (2021).
36. R. Niero, S. Faloni de Andrade, V. Cechinel Filho, A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus, *Curr. Pharm. Des.*, **17**(18), 1851-1871 (2011).
37. R.R.H. Amin, B.H. Marouf, Clinical biomarkers and use of herbal products in gastric injury, *Al-Rafidain J. Med. Sci.*, **2**, 8-15 (2022).
38. A. Martelli, V. Theodoro, F.O.G. Gaspi, M.E.C. Amaral, R.A. Dalia, A.A. Aro, M.A.M. Esquisatto, F.A.S. Mendonça, T.A.M. Andrade, G.M.T. Santos, *Casearia sylvestris* improved cutaneous burn repair in diabetic rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **6**(6), 551-562 (2018).
39. J.A.R. Neto, B.R.P. Tarôco, H.B. Dos Santos, R.G. Thomé, E. Wolfram, R.I.M.d.A. Ribeiro, Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach, *J. Ethnopharmacol.*, **260**, 112547 (2020).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

E.C. Primon, S.B. da Rocha, R.M. Bonilha-Dezena, G.H. da Silva, Study to determine the regenerative activity of tincture of *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) and *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) in an experimental model using *Escherichia coli* cultures, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 826-841 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110744>

## Estado del arte en la estandarización de extractos vegetales

Wilson Leonardo Villarreal Romero<sup>1a</sup>, Jorge Eliecer Robles Camargo<sup>1b</sup>,  
Geison Modesti Costa<sup>c\*</sup>

Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Edificio Carlos Ortiz (52), Cra. 7 #43-82, Bogotá D.C., Colombia

ORCID:

<sup>a</sup><https://orcid.org/0000-0001-9468-9977>, <sup>b</sup><https://orcid.org/0000-0002-6782-5619>,

<sup>c</sup><https://orcid.org/0000-0003-2449-1986>

\*Autor de correspondencia: [modesticosta.g@javeriana.edu.co](mailto:modesticosta.g@javeriana.edu.co)

Recibido: 23 de enero de 2023

Revisado: 20 de abril de 2023

Aceptado: 27 de abril de 2023

### RESUMEN

**Introducción:** el aumento en el uso de plantas medicinales ha sido evidenciado en las últimas décadas en todo el mundo, principalmente como extractos vegetales con fines terapéuticos. Para garantizar la calidad y la eficacia de estos extractos se han establecido guías y normativas que reducen la variabilidad de los procesos de obtención y aseguran su estandarización. **Objetivo:** compilar datos actuales sobre los principales parámetros y metodologías para la estandarización de extractos vegetales y sus definiciones. **Metodología:** guías de la Organización Mundial de la Salud, Farmacopeas y las bases de datos PubMed, Google Académico, Science Direct y EBSCOHost fueron empleadas para coleccionar información acerca de la estandarización de extractos. Los documentos fueron seleccionados de acuerdo con su fecha de publicación (1981-2020), utilizando palabras-clave en inglés como “*standardization of plant extracts*”, “*standardization of methodologies*” y “*guidelines for obtaining standardized products*”. **Resultados:** las farmacopeas y las guías de la Organización Mundial de la Salud son la literatura principal que establecen las metodologías para la estandarización, así como los límites de parámetros relacionados con el control de calidad de extractos vegetales. Los principales parámetros establecidos fueron: evaluación macro y microscópica del material vegetal, materia extraña, contenido de cenizas, contenido de agua, análisis cromatográficos, análisis biológicos y evaluación química cualitativa y cuantitativa. **Conclusiones:** los principales documentos guías para la estandarización de extractos vegetales son generalmente aceptados en la

mayoría de las agencias regulatorias en diferentes países y determinan lineamientos relacionados con las características fisicoquímicas, biológicas y químicas analíticas del material vegetal y de los extractos.

**Palabras clave:** Estandarización, extractos, plantas medicinales, fitoterapéuticos, control de calidad.

## SUMMARY

### State of the art in the standardization of herbal extracts

**Introduction:** The increase in the use of medicinal plants has been evidenced in recent decades throughout the world, mainly as plant extracts with therapeutic purposes. To guarantee the quality and efficacy of these extracts, guidelines, and regulations have been established with the purpose to reduce the variability of obtaining processes and ensure their standardization. **Aim:** To compile current data on the main parameters and methodologies for the standardization of plant extracts and their definition. **Methodology:** World Health Organization guidelines, Pharmacopoeias and PubMed, Google Scholar, Science Direct, and EBSCOHost databases were used to collect information about extract standardization. The documents were selected according to their publication date (1981-2020), using keywords in English such as “standardization of plant extracts”, “standardization of methodologies” and “guidelines for obtaining standardized products”. **Results:** Pharmacopoeias and guidelines of the World Health Organization are the main literature that supported the methodologies for standardization, as well as the limits of parameters related to the quality control of plant extracts. The main parameters established were macro and microscopic evaluation of plant material, foreign matter, ash content, water content, chromatographic analysis, biological analysis, and qualitative and quantitative chemical evaluation. **Conclusions:** The main guide documents for the standardization of plant extracts are generally accepted by most regulatory agencies in different countries and determine guidelines related to the physicochemical, biological, and analytical chemical characteristics of plant material and extracts.

**Keywords:** Standardization, extracts, medicinal plants, phytotherapeutic, quality control.

## RESUMO

### Estado da arte na padronização de extratos vegetais

**Introdução:** o aumento do uso de plantas medicinais tem sido evidenciado nas últimas décadas em todo o mundo, principalmente na forma de extratos vegetais para fins terapêuticos. Para garantir a qualidade e eficácia desses extratos foram estabelecidos diretrizes e regulamentações que reduzem a variabilidade dos processos de obtenção e garantem sua padronização. **Objetivo:** compilar dados atuais sobre os principais parâmetros e metodologias de padronização de extratos vegetais e suas definições. **Metodologia:** diretrizes da Organização Mundial da Saúde, Farmacopeias e bancos de dados PubMed, Google Scholar, Science Direct e EBSCOHost foram usados para coletar informações sobre padronização de extratos. Os documentos foram selecionados de acordo com a data de publicação (1981-2020), utilizando palavras-chave em inglês como “padronização de extratos vegetais”, “padronização de metodologias” e “diretrizes para obtenção de produtos padronizados”. **Resultados:** farmacopeias e diretrizes da Organização Mundial da Saúde são as principais literaturas que estabelecem as metodologias para padronização, bem como os limites de parâmetros relacionados ao controle de qualidade de extratos vegetais. Os principais parâmetros estabelecidos foram avaliação macro e microscópica do material vegetal, matéria estranha, teor de cinzas, teor de água, análise cromatográfica, análise biológica e avaliação química qualitativa e quantitativa. **Conclusões:** os principais documentos orientadores para a padronização de extratos vegetais são geralmente aceitos na maioria das agências reguladoras em diferentes países e determinam diretrizes relacionadas às características físico-químicas, biológicas e químicas analíticas de materiais vegetais e extratos.

**Palavras-chave:** Padronização, extratos, plantas medicinais, fitoterápicos, controle de qualidade.

## INTRODUCCIÓN

El uso de medicinas herbales históricamente ha constituido una práctica importante, incluso en la medicina actual en donde más del 80% de la población utiliza y/o depende de plantas medicinales. Pero este amplio uso ha generado en algunos casos errores de medicación, adulteración o abuso en el consumo de los productos medicinales a base de plantas, produciendo efectos nulos o negativos para la salud de los consumidores. De ahí el hecho que sea necesario el establecimiento de parámetros de

control de calidad para la recolección, manejo, procesamiento y producción, garantizando la buena calidad y consecuentemente la eficiencia y la seguridad de medicamentos y productos a base de plantas [1-4].

De esta forma la Organización Mundial de la Salud (OMS–WHO por sus siglas en inglés) en 1978 en la declaración de Alma Anta, mediante la resolución WHO 31.33 teniendo en cuenta la importancia de las plantas medicinales en la salud, recomendó la creación de un inventario de plantas empleadas con fines terapéuticos en diferentes países, el desarrollo de métodos que aseguren la calidad y la eficacia de tratamientos con plantas medicinales, estándares internacionales que especifiquen la identidad, la pureza, los métodos seguros de utilización y las buenas prácticas de manufactura. Estos puntos fueron reafirmados en 1987 en la 40ª Asamblea General de la OMS mediante la resolución 40.33 la cual incentiva a seguir programas de identificación, cultivo y conservación de plantas medicinales, con el fin de asegurar la calidad mediante estándares y buenas prácticas de manufactura de los productos medicinales obtenidos a partir de estas plantas [5-10].

En muchos países los productos herbales medicinales o fitoterapéutico son liberados al mercado sin una evaluación científica debida y teniendo en cuenta que la mayoría de estos productos pueden ser adquiridos sin prescripción, principalmente en países de América Latina, se vuelve importante la producción de fitoterapéuticos de calidad con una composición constante y bien definida, lo cual se logra mediante la estandarización [2, 10-15]. El proceso de estandarización de extractos es específico y por lo tanto diferente para cada especie, por lo cual el objetivo de esta revisión fue presentar definiciones, lineamientos y metodologías generales para la obtención de extractos estandarizados, de modo que pueda servir como fuente de información base para estos procesos.

## METODOLOGÍA

Esta revisión se llevó a cabo mediante la búsqueda en la literatura científica en lo referente a extractos estandarizados, métodos de estandarización, sus aplicaciones y su justificación. Compilando información desde los aspectos básicos y fundamentales, hasta estudios de estandarización actuales y específicos. Para esta revisión se utilizaron las bases de datos: Science Direct, Academic Search Complete (EBSCOHost), PubMed y el motor de búsqueda de Google Académico, así como capítulos y libros especializados, normas nacionales e internacionales y directrices establecidas por la OMS y las farmacopeas: Brasileña, Estadounidense y Europea.

Los documentos fueron escogidos de acuerdo con sus fechas de publicación (entre los años 1981 y 2020), usando palabras clave en inglés tales como: “standardization of

plant extracts”, “natural products”, “standardization of methodologies” and “guidelines for obtaining standardized products”. El conjunto de información finalmente incluyó 95 referencias, entre artículos científicos publicados, guías, normas, libros y monografías de farmacopeas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Consideraciones legales

Según el país y sus normativas se emplean términos como fitoterapéuticos o fitomedicamentos, términos que pueden cambiar en algunos aspectos en cuanto a sus definiciones [16, 17]. Los fitoterapéuticos son un tipo de preparación herbaria derivada de partes de una o varias plantas, en donde los principios activos no se encuentran de forma aislada. Son obtenidos por diferentes formas de procesamiento del material vegetal y estos pueden ser material triturado, aceites esenciales o extractos, entre otros [16, 18]. Los extractos que son obtenidos sin la aplicación de sustancias inertes, se denominan extractos naturales y están definidos como preparaciones herbarias [19, 20], de consistencia líquida, sólida o semisólida (extractos blandos obtenidos por evaporación parcial del solvente) o tinturas (preparaciones líquidas obtenidas por extracción con alcohol) [17]. Cabe mencionar que los extractos vegetales no solo son aplicables a la medicina y la farmacéutica, es conocida también su función en la nutraceutica, por ejemplo, para la cual sus normativas suelen ser distintas y no serán abordadas en esta revisión [21-24].

La IV Conferencia Internacional de Organismos de Reglamentación Farmacéutica realizada en Tokio en 1986 avanzó en la legislación de productos medicinales derivados de plantas, principalmente en temas relacionados con la explotación comercial. En la conferencia número V llevada a cabo en París en 1989, se amplió la reglamentación y se recomendó que la OMS examinara la preparación de dichas plantas y generara normas que ayudaran en el proceso de reglamentar la preparación en un contexto global, para esto la OMS estableció una serie de lineamientos para la evaluación de medicamentos de origen vegetal. Y que junto a la Organización de Naciones Unidas para el Desarrollo (ONUDI) han hecho importantes esfuerzos para que el empleo de estos medicamentos de origen vegetal sea una solución real alternativa a los fármacos sintéticos de elevado costo [5].

En Colombia, país de los autores, los fitoterapéuticos están reglamentados por el decreto 2266 del 2004 [25], modificado por los decretos 3553 de 2004 [26], 4927 de 2009 [27] y el decreto 1156 del 2018 [28], emitidos por el Ministerio de Salud y Protección Social que definen los productos fitoterapéuticos como: *“Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la*

*planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. También puede provenir de extractos, tinturas o aceites. No podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos. Los productos obtenidos de material de la planta medicinal que haya sido procesado y obtenido en forma pura no será clasificado como producto fitoterapéutico”* [25, 28]. También se establece en estos decretos que la vigilancia y el registro sanitario de los productos fitoterapéuticos en nuestro país corresponde al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) [25-28]. Mientras que en el caso de Brasil es la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) [29, 30], en México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) [31] y para los Estados Unidos la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) [32, 33].

### **Estandarización de extractos vegetales**

La estandarización de extractos vegetales se refiere al establecimiento de una serie de parámetros y valores en un proceso dado, que permitan garantizar la calidad, la eficacia, la estabilidad y la reproducibilidad. No existe una definición universal de lo que es “estandarización de extracto” pero en general se refiere al establecimiento de la cantidad definida de un compuesto o grupo de compuestos con una actividad terapéutica determinada (principio activo o mezclas de este) dentro de un extracto y a la metodología empleada para llegar a él [21, 34, 35]. Los extractos estandarizados contienen una cantidad constante de componentes específicos (principios activos) o mezclas con ellos, sujetos a controles de calidad durante todas sus fases de preparación, por lo tanto, la estandarización no se refiere únicamente a procesos uniformes de fabricación [1, 2, 21, 36-38].

La estandarización junto con el control de calidad tiene en cuenta los procesos que contribuyen a la identidad y calidad de un medicamento de origen vegetal, estos procesos incluyen: obtención del material vegetal, identificación, evaluación cuantitativa, evaluación cualitativa, caracterización fitoquímica, estabilidad y almacenamiento, de igual forma la obtención y suministro de la información del producto final al consumidor [1, 38, 39].

El proceso de estandarización de extractos vegetales también se puede entender como la caracterización técnica obtenida mediante experimentación y observaciones que conducen a un conjunto de características específicas para un medicamento de origen vegetal. En otras palabras, la estandarización también es “*una herramienta en el proceso de control de calidad*” [1], cuyos lineamientos se encuentran en los documentos guía de la OMS y las farmacopeas [15, 40, 41].

Por otra parte, la Agencia Europea de Medicina (EMA) define la estandarización de sustancias (extractos) vegetales como: “*Las sustancias herbales estandarizadas se ajustan dentro de una tolerancia aceptable a un contenido dado de constituyentes con actividad terapéutica conocida; La estandarización se logra agregando excipientes para el ajuste a la sustancia a base de hierbas o mezclando lotes de la sustancia a base de hierbas. Para tales sustancias a base de hierbas, debe indicarse el nombre y el contenido de los constituyentes con actividad terapéutica conocida. Se debe dar la cantidad equivalente de la sustancia herbal genuina (como un rango, si corresponde)*” [42]. De esta definición se entiende que el producto final debe contener componentes activos de identidad y cantidad conocida o en un rango de cantidad [42].

### ¿Qué se estandariza?

Los parámetros requeridos y algunos de sus límites para productos fitoterapéuticos, entre los que se clasifican los extractos estandarizados, son enunciados por la OMS y las farmacopeas que establecen usos terapéuticos estandarizados de plantas medicinales y publican monografías de especies medicinales con información sobre la descripción botánica [7, 9, 43-48]. Los parámetros están descritos en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Requerimientos establecidos para productos fitoterapéuticos.

Material	Límites permitidos	Referencia
<b>Para el material vegetal</b>		
Caracterización botánica	Parámetros cualitativos intrínsecos del tipo de planta.	[14, 16]
Examen macro y microscópico	Parámetros cualitativos intrínsecos del tipo de planta/extracto.	[7, 46]
Materia extraña	< 2%.	[7, 46, 49]
Valores de ceniza	Intrínseco de cada planta, por lo general < 5% para cenizas totales y < 2% para cenizas insolubles en ácido.	[7, 17, 49]
Contenido de humedad	Intrínseco de cada planta, generalmente < 10%.	[7, 46, 49]
Valores extractivos	Intrínsecos para cada tipo de planta.	[7, 46, 49]

(Continúa)



Material	Límites permitidos	Referencia
Carga microbiana	Para extracciones por decocción: **TAMC: $10^7$ CFU/g ***TYMC: $10^5$ CFU/g Para extracciones por solventes orgánicos: TAMC: $10^4$ CFU/g o CFU/mL TYMC: $10^2$ CFU/g o CFU/mL	[46, 49]
Residuos de pesticidas	Acefato 0,2 mg/Kg Clorpirifós 5 mg/Kg Dicofol 0,05 mg/Kg Este parámetro se amplía en la tabla 3	[7, 46, 49]
Contenido de metales pesados	Cadmio: < 1,0 ppm Plomo: < 5,0 ppm Mercurio: < 0,1 ppm	[7, 49]
<b>Para el extracto</b>		
VARIABLES DEL PROCESO EXTRACTIVO (SOLVENTES Y MÉTODO EXTRACTIVO)		[14, 16]
ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO		[14, 17]
EVALUACIÓN QUÍMICA CUALITATIVA (TAMIZAJE FITOQUÍMICO)		[7, 16]
EVALUACIÓN QUÍMICA CUANTITATIVA		[14, 16]
ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS		[14, 15, 17]

\*Recuento total de microorganismos aerobios (TAMC). \*\* Unidad formadora de colonias (UFC) por gramo de material vegetal. \*\*\* Recuento total de hongos y levaduras (TYMC)

### ¿Cómo se estandariza? Caracterización del material vegetal

Los criterios para caracterización y evaluación de plantas medicinales pueden variar entre las diferentes farmacopeas que existen, pero hay lineamientos que son comunes a la mayoría de las disposiciones legales de cada país. Teniendo en cuenta las farmacopeas Brasileña, Europea y Estadounidense junto con los requerimientos de la OMS, los ensayos contemplados para el análisis de drogas vegetales antes de ser empleadas para la elaboración de un fitoterapéutico se describen globalmente a continuación [2, 6, 7, 46, 50-52].

### *Recolección del material vegetal*

El momento de recolección de las plantas medicinales depende de la especie, las condiciones climáticas y el ciclo de la planta. Para su recolección se puede realizar un seguimiento previo, con el fin de conocer la edad de la planta y la mejor época para su recolección. Este seguimiento se puede realizar con extracciones continuas por un periodo de tiempo determinado analizando los extractos mediante alguna técnica cromatografía [13, 50].

### *Limpieza*

Al limpiar las partes vegetales colectadas se retiran todas las impurezas como tierra, insectos partes de otras plantas y partes dañadas necrosadas o con marcas de herbivoría. Parte del procedimiento se realiza manualmente. Se puede realizar un lavado con agua para limpiar el material adherido, de igual forma se puede realizar una desinfección con hipoclorito de sodio de concentración menor al 1% durante 5 minutos, con el fin de limitar una posible infección bacteriana, pero se corre el riesgo de oxidar los componentes activos [50, 53].

### *Secado del material vegetal*

El secado del material facilita su almacenamiento durante periodos de tiempo relativamente largos, conservando las propiedades químicas de los compuestos, a su vez detiene los procesos bioquímicos de la planta e impide la contaminación por hongos [13, 54]. El secado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente usualmente en sombra o en hornos con circulación de aire entre 30 °C y 60 °C [13, 53].

### *Evaluación microscópica y macroscópica*

El primer paso para establecer la identidad y pureza es la descripción macro y microscópica. La evaluación microscópica es indispensable en la identificación de plantas y de fragmentos de material vegetal producto de estas, así mismo es necesaria para la identificación de materia extraña y adulterantes. En ella se emplea la evaluación visual primaria con ayuda de reactivos que faciliten la visualización y de un microscopio o un estereoscopio para la identificación taxonómica correcta y asegurar que se está empleando la parte de interés de la planta. Esta identificación se hace con ayuda de una muestra autentica de referencia de la planta [1, 6, 46, 50, 52, 55, 56]. Se analizan características de las paredes celulares, contenido celular (almidón), presencia de tricomas, índice de estomas (relación estomas/área de la hoja) y materia extraña, entre otros [15]. En la evaluación macroscópica se describen las características externas de los órganos vegetales, la OMS recomienda proceder evaluando, tamaño, color, superficie,

olor (intensidad del olor: suave, fuerte. Tipo de aroma: aromático, mohoso, rancio) y describiendo las características morfológicas de tamaño, borde y textura [6, 46, 55].

### Molienda del material vegetal y distribución del tamaño de partícula

La molienda o trituración de material se realiza con el fin de aumentar la superficie del material vegetal que va a estar en contacto con el solvente de extracción, y de esta forma aumentar la penetración y el poder extractivo. Por otro lado, la formación de polvo muy fino puede dificultar los procesos de extracción. Durante este proceso materiales extraños o no deseados pueden ser identificados y retirados manualmente [2, 49].

Independientemente del proceso de trituración, se generan partículas de diferentes tamaños, estas partículas o fragmentos deben ser seleccionadas usando tamices con luz de malla de diferente diámetro, y el material a tamizar debe llevar una cantidad (peso) definida. La OMS y la farmacopea Brasileña clasifican los diferentes tipos de polvo (Tabla 2) [13, 46, 49, 51].

**Tabla 2.** Clasificación de los tipos de polvo de acuerdo con el material vegetal que pasa en su totalidad por determinado tamiz [46, 49, 51].

Clasificación	Tamiz
Polvo grueso	tamiz de 1,70 mm
Polvo moderadamente grueso	tamiz de 0,71 mm
Polvo semifino	tamiz de 0,33 mm
Polvo fino	tamiz de 0,18 mm
Polvo finísimo	tamiz de 0,12 mm

### *Determinación de cenizas*

El contenido de ceniza refleja el contenido de materia inorgánica. Para su determinación el material vegetal se incinera y las cenizas residuales son pesadas determinando la cantidad de ceniza total, ceniza insoluble en ácido y ceniza soluble en agua. La determinación de cenizas totales se realiza para medir la cantidad de ceniza correspondiente al material vegetal y al material restante que corresponde a materia extraña, las cenizas totales no deben superar el 12% respecto al material vegetal, valores más altos se pueden deber a contaminación con suelo [6, 7, 46, 57].

### *Determinación de humedad y pérdida por secado*

Generalmente el contenido de agua de las drogas vegetales varía entre 8% y 14%, este contenido se debe mantener bajo para evitar hidrólisis de los compuestos y posibles contaminaciones microbiológicas. El contenido de agua puede ser determinado por el

método gravimétrico (secar hasta peso constante), azeotrópico (destilación de la muestra junto con tolueno) y el método de Karl Fischer (reacción cuantitativa entre agua, yodo y dióxido de azufre en piridina) [46, 50, 51].

#### *Determinación de sustancias extraíbles*

Este procedimiento se realiza en el caso que no se puedan determinar los componentes activos de la droga. Se puede realizar entonces una determinación de las sustancias extraídas con agua y/o etanol [13, 46, 51, 58].

#### *Determinación de material extraño*

Los extractos vegetales regularmente provienen de una sola parte de la planta, es decir de un órgano específico, por lo tanto, debe asegurarse que no haya fragmentos de otras partes de la planta o de otras plantas, también se debe detectar la presencia de insectos o de material inorgánico [7, 46, 51, 59]. De existir contaminación se recomienda eliminar de forma mecánica directamente sobre el material vegetal, en caso de que este esté fraccionado en partes grandes [51, 60].

#### *Contaminantes microbiológicos*

La contaminación con microorganismos está asociada con factores ambientales de difícil control. La carga de microorganismos en el material vegetal se ve favorecida también por malas prácticas de cosecha, limpieza, secado y almacenamiento. También existen métodos de descontaminación que están restringidos, como el tratamiento de radiación ionizante, por lo tanto, debe cuidarse tanto el método de limpieza como de la presencia de microorganismos y posibles toxinas producidas por estos [7, 46, 61]. Los microorganismos que están presentes en el material vegetal pueden proliferar en los procesos de secado y almacenamiento [1]. Los límites para la contaminación microbiana están dados por farmacopeas, pero no son de implementación obligatoria [1, 17].

#### *Determinación de metales pesados*

La contaminación ambiental y las trazas de pesticidas son responsables en gran medida de la presencia de metales pesados en el material vegetal. Su contaminación es importante en la salud debido a que su acumulación en el organismo resulta tóxica [6-8, 46]. Existen varios tipos de determinación de estos metales cuyo contenido se debe comparar con un valor o rango estándar (ver Tabla 1). Un método común para su identificación es la espectrofotometría de absorción atómica [62].

#### *Residuos de pesticidas*

Dado que la mayoría de los productos naturales provienen de plantas cultivadas, existe una alta probabilidad de que estén contaminados con residuos de pesticidas acumula-

dos por las prácticas agrícolas como la aplicación de abonos químicos y de fungicidas. Para su detección se pueden hacer pruebas generales que reconozcan grupos de pesticidas o pesticidas individuales [6, 8, 46]. Se recomienda realizar pruebas generales para detectar cloro orgánico total, fosforo orgánico total, arsénico y plomo total. El análisis debe realizarse lo más pronto luego de la recolección del material vegetal antes de que tengan lugar cambios químicos. Los valores máximos permitidos de pesticidas dependen del grupo químico al que pertenezcan, (organoclorados, organofosforados, etc.), y sus límites son reportados por la OMS y la farmacopea Europea (Tabla 3) [6, 33, 46, 63].

**Tabla 3.** Límites máximos permitidos de algunos pesticidas [38, 49].

Pesticida	Límite máximo de residuo (mg/Kg)
Acefato	0,2
Azinfos.Metil	0,5
Clorpirifós	5
Clorpirifós-Metil	1
Diazinón	5
Dicofol	0,05

### *Extracción*

Es importante mencionar que incluso obteniendo material vegetal consistente y siguiendo las normas de estandarización en el tratamiento del material vegetal, el extracto resultante podrá no ser igual en caso de que no se haga el control del proceso extractivo. La extracción se realiza poniendo en contacto el material particulado con el solvente extractor. La elección del solvente va a depender del tipo de material y del tipo de compuestos a extraer [64-68]. En cuanto a la cantidad de material vegetal y la proporción de solvente, esta se podrá determinar realizando pruebas preliminares de extracción verificadas por cromatografía.

### **Control de calidad de los extractos vegetales**

#### *Evaluación química*

Uno de los aspectos más importantes en la estandarización de un extracto es la evaluación química. Uno de los pasos más comunes e iniciales en esta etapa es el tamizaje o *screening* fitoquímico, que se refiere a las diferentes pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios como: terpenos, alcaloides, cumarinas, lactonas, taninos, fenoles, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, esteroides, quinonas, lignanos, cromanos y catequinas, principalmente [13, 69].

Otras pruebas más robustas para identificación y que además pueden proporcionar un análisis cuantitativo son las técnicas Cromatografía en Capada Delgada (TLC), Cromatografía en Capada Delgada de alta Resolución (HPTLC), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), acoplada a diferentes detectores como Ultravioleta (UV), Detector de Arreglo de Diodos (DAD) y Espectrometría de Masas (MS), Cromatografía de Gases (GC), también con distintos detectores como ionización de llama (FID) o MS. Otras técnicas menos comunes en etapas del control de calidad, pero también bastante eficientes son la Electroforesis Capilar (CE) y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Los resultados de estas técnicas generan huellas químicas cromatográficas sobre la cuales se pueden comparar cualitativa y cuantitativamente con otras muestras [1, 15, 70, 71]. Por ser las técnicas más comunes en estos procesos, se dará especial énfasis en dos de ellas: TLC y HPLC, descritas a continuación.

### **Cromatografía en Capa Delgada (TLC) para el análisis de productos fitoterapéuticos**

La cromatografía en capa delgada es una técnica importante en el monitoreo necesario de componentes químicos para el proceso de estandarización y control de calidad de los extractos vegetales, ya que es una técnica poco costosa comparada a las demás técnicas cromatográficas. Respecto al control de calidad el primer paso es identificar los compuestos que están presentes y son característicos de la planta y cuáles de estos poseen actividad farmacológica. Se deben escoger los solventes más apropiados como sistema de elución para el desarrollo cromatográfico, junto con los reveladores a emplear para la visualización de los compuestos presentes en el extracto. La etapa siguiente es el monitoreo de compuestos específicos, los cuales servirán como marcadores ayudando a identificar el extracto y por consiguiente la planta [70-75].

Los marcadores químicos son componentes conocidos químicamente con o sin actividad terapéutica, estos pueden ser marcadores analíticos o marcadores activos. *“Los marcadores analíticos son los constituyentes o grupos de constituyentes que sirven únicamente para fines analíticos, mientras que los marcadores activos son los constituyentes o grupos de constituyentes que contribuyen a la actividad terapéutica”* [76]. Estos marcadores cobran importancia en la identificación de compuestos adulterantes, la diferenciación de medicinas vegetales provenientes de diferentes fuentes y en la verificación de la estabilidad de los fitoterapéuticos [76].

Independiente del nivel de conocimiento de la composición química del extracto, se acepta como un análisis válido en el control de calidad la obtención de un perfil cromatográfico. A este perfil se le conoce como huella digital o *fingerprint* de la planta. Esto es funcional siempre y cuando el proceso de obtención de la planta posea condiciones definidas (estandarizadas). De esta forma un segundo extracto obtenido en las mismas condiciones de colecta, procesamiento y extracción deberá ser comparable al realizar la

misma prueba cromatográfica. Los resultados de la TLC se comparan por los factores de retención ( $R_f$ ), tamaños y coloraciones de los compuestos. Una variación de esta técnica de TLC es la HPTLC, automatizada y de mayor resolución y precisión, permitiendo además la cuantificación mediante densitómetros [13, 77].

### **Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para el análisis de productos fitoterapéuticos**

Esta técnica es la más ampliamente utilizada en el control de calidad de extractos vegetales. Así como se describió anteriormente, esta técnica también permite la obtención del perfil cromatográfico de los extractos, en este caso, visualizados por medio de picos cromatográficos [78, 79].

Los detectores empleados en esta técnica dependen de las estructuras que se desea analizar. Los detectores UV son los más utilizados, permitiendo el análisis de los compuestos que poseen grupos cromóforos. La variación de este, llamada DAD o PDA (detección por arreglo de fotodiodos) permite obtener el espectro de absorción de un determinado compuesto y por consiguiente la comparación de espectros con un banco de datos o literatura, donde se puede estimar la naturaleza química de los componentes de un extracto. Adicionalmente, otros detectores comúnmente empleados son: Detector Evaporativo de Dispersión de Luz (ELSD) el cual es empleado para la detección de moléculas sin grupos cromóforos que resultan indetectables en UV, se fundamenta en la nebulización de sustancias formando un spray homogéneo de gotas que pasan por un detector de aerosol cargado, y el detector MS el cual separa moléculas orgánicas ionizadas de acuerdo a su masa y carga, posteriormente estos iones son detectados por un analizador de campo magnético; analizador cuadrupolar o un analizador de trampa de iones [13, 58, 70, 80-82].

#### *Validación*

La validación es el proceso de probar que un método analítico es aceptable para su propósito previsto [1]. También permite establecer criterios de adaptación para pruebas determinadas. La Farmacopea de los Estados Unidos [17], la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) [83] y la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [84] suministran una serie de lineamientos para realizar las validaciones. La validación debe incluir estudios de linealidad, especificidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación [1, 46, 84-88].

#### *Parámetros de validación*

*Precisión:* grado de proximidad entre una variedad de mediciones individuales obtenidas a partir de una misma muestra con una metodología determinada. La precisión

puede ser considerada en, **Repetibilidad**: precisión en las mismas condiciones de operación en un tiempo dado. Es evaluada realizando varias veces la misma medición y viendo el grado de variación entre las mediciones. **Precisión intermedia**: precisión que tiene en cuenta las variaciones. **Reproducibilidad**: precisión entre laboratorios, grado de proximidad de un resultado a partir de muestras diferentes con una metodología determinada [1, 83, 84, 87, 88]. *Seguridad*: uso probado y posibles efectos adversos de los principios activos, principalmente en lo relacionado con la toxicidad [8]. *Exactitud*: grado de proximidad entre el resultado de una medición experimental y un valor teórico (estándar) en una misma muestra con una metodología determinada. *Límite de detección*: Es la cantidad mínima a la que un analito en una muestra puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado. *Límite de cuantificación*: Cantidad mínima de un analito en ser cuantificada con exactitud. *Linealidad*: Capacidad de un procedimiento analítico de obtener un resultado proporcional a la concentración de una muestra o de un analito dentro de una muestra [83, 84, 87, 88]. *Identidad y pureza*: se refiere a la posible contaminación de la droga o del extracto. Para controlar la identidad y la pureza de un extracto principalmente se realizan pruebas cromatográficas con el fin de identificar la presencia de posibles adulterantes [7, 59, 89]. Los valores de los parámetros de validación se resumen en la Tabla 4.

### *Estabilidad*

La estabilidad se refiere a la capacidad de un producto farmacéutico de conservar sus características biológicas y farmacéuticas junto con sus propiedades físicas y químicas dentro de los límites especificados (en la estandarización) en un tiempo dado. La estabilidad se estima con base en la cantidad y tiempo exposición a condiciones controladas de luz, temperatura y humedad del ambiente, y de las características propias del compuesto a almacenar, es decir su solubilidad, volatilidad, degradabilidad y reactividad química [2, 52, 90-93].

Los objetivos de evaluar la estabilidad de un producto (extracto vegetal) o principio activo son mantener la pureza, la potencia, la concentración y la efectividad, en un tiempo dado, lo cual es evaluado mediante pruebas de estabilidad que hacen parte del control de calidad de un producto fitoterapéutico [2, 52, 93, 94].

Los estudios de estabilidad para extractos vegetales emplean guías similares a las utilizadas para fármacos y medicamentos. Y se pueden valorar vía 3 ensayos principales: ensayo por estrés, estabilidad acelerada y estabilidad intermediaria. Su análisis se realiza principalmente mediante HPLC o TLC [93, 95, 96].



**Tabla 4.** Procedimientos generales y valores de los parámetros de validación.

Parámetro de Validación	Procedimientos Analíticos Generales	Referencia
Exactitud	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se determinan 3 concentraciones con tres réplicas, en un rango específico.</li> <li>• Se determinan el % de recuperación. Considerando la media y la desviación estándar relativa (DSR), como estimados de precisión.</li> <li>• % de exactitud entre 80 y 120 %</li> </ul>	[83, 84]
Precisión	<p>Repetibilidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones realizadas por un único analista y bajo las mismas condiciones.</li> <li>• Se realizan mínimo 9 o 10 mediciones diferentes, teniendo en cuenta la exactitud.</li> <li>• DSR recomendadas, &lt; 11%</li> </ul> <p>Precisión Intermedia:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones realizadas en días y analistas diferentes</li> <li>• Se realizan mínimo 9 o 10 mediciones diferentes, teniendo en cuenta la exactitud.</li> <li>• DSR recomendadas, &lt; 11%</li> </ul>	[83, 84]
El límite de Detección	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se expresa como el producto de la pendiente de la curva de calibración y 3.3, dividido entre la desviación estándar del blanco o del intercepto en el eje y, de la curva de calibración.</li> <li>• Puede ser expresado como 2 o 3 veces la señal del ruido.</li> <li>• También puede ser determinado visualmente analizando bajas concentraciones conocidas de un analito.</li> </ul>	[84, 88]
El límite de Cuantificación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es el producto de la pendiente de la curva de calibración y 10, dividido entre la desviación estándar del blanco o del intercepto en el eje y, de la curva de calibración.</li> <li>• Puede ser expresado en una proporción señal ruido de 10:1 respecto a un analito determinado.</li> <li>• También puede ser determinado visualmente analizando bajas concentraciones conocidas de un analito.</li> </ul>	[84, 88]

Parámetro de Validación	Procedimientos Analíticos Generales	Referencia
Linealidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se establece con rango de mínimo 5 concentraciones, obtenidas de una solución stock.</li> <li>• Se evalúa mediante regresión lineal, entre la relación concentración-sígnal.</li> <li>• Se debe tener en cuenta el intercepto en el eje <math>y</math>, el coeficiente de correlación y la pendiente.</li> <li>• El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.999.</li> </ul>	[84, 88]
Especificidad/ selectividad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se determina por identificación del analito de interés y por discriminación de impurezas.</li> <li>• Los análisis de selectividad pueden incluir ensayos de estabilidad que permitan comparar muestras que contengan impurezas y/o productos de degradación.</li> </ul>	[84, 88]
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se realizan pruebas de idoneidad del sistema o procedimiento a evaluar, comprobando la validez del procedimiento analítico.</li> </ul> Comúnmente se evalúa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incidencia del pH</li> <li>• Temperatura</li> <li>• Tiempo de extracción</li> <li>• Estabilidad de las soluciones analíticas</li> </ul>	[83, 88]

## CONCLUSIÓN

Los medicamentos a base de especies vegetales principalmente en forma de extractos, son una fuente importante para la industria farmacéutica, pero aún existen vacíos en el establecimiento de su calidad, por lo que se hace imperante la necesidad de estandarizar estos productos derivados de vegetales. Los principales Documentos Guía para la estandarización y el control de calidad, han sido generados por la OMS y por las farmacopeas. Se ha creado una gran variedad de métodos y de herramientas analíticas para evaluar diferentes parámetros de calidad que garanticen la calidad y la eficiencia de un fitoterapéutico, junto con metodologías para eliminar la variabilidad de los productos vegetales, todo esto con el fin de obtener extractos estandarizados como productos finales, con alto grado de calidad, eficiencia y reproducibilidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, al Ministerio de Educación, al Ministerio de Industria, Empresa y Turismo, ICETEX y a la convocatoria “Ecosistema Científico” (792-2017) por permitirnos participar y contribuir al proyecto “Generación de soluciones terapéuticas alternativas a base de plantas para combatir el cáncer a través de la investigación y el desarrollo traslacional y su consolidación en un sistema sostenible económica y ambientalmente” (contrato No. FP44842-221-2018) financiado por el Banco Mundial y consolidando la excelencia en la investigación y la innovación en nuestro país.

## FINANCIAMIENTO

Los autores confirman haber recibido el siguiente apoyo financiero para la investigación, autoría y / o publicación de este artículo: El financiamiento fue proporcionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia (792-2017 2da Convocatoria de Ecosistema Científico para el financiamiento de I + D + i), Banco Mundial y Vicerrectoría de Investigaciones, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia (contrato No. FP44842-221-2018).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

## REFERENCIAS

1. O.F. Kunle, M.O. Egharevba, P.O. Ahmadu, Standardization of herbal medicines - A review, *Int. J. Biodivers. Conserv.*, **4**, 101-112 (2012).
2. S. Echeverry, *Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de Passiflora quadrangularis*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, 2017.
3. C.S. Jackson, J.S. Han, H. El-Nezami, Herbal medicine: Toxicity and recent trends in assessing their potential toxic effects, en: L.F. Shyur, A.S.Y. Lau (editors), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, Oxford, 2012, Vol. 62, pp. 365-384.

4. M.S. Ahmad, I. Ahmad, Chapter 1 - Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects, en: M. Sajjad, A. Khan, I. Ahmad, D. Chattopadhyay (editors), *New Look to Phytomedicine Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads*, Academic Press, Oxford, 2019, pp. 3-11.
5. M. Vega, *Etnobotánica de la Amazonia Peruana*, Ediciones Abya-Yala, Quito, 2001, pp. 51-55.
6. World Health Organization (WHO), *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, WHO, Geneva, 1992.
7. World Health Organization (WHO), *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, WHO, Geneva, 1998.
8. World Health Organization (WHO), *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, WHO, Geneva, 2000.
9. World Health Organization (WHO), "Global Atlas of Traditional, Complementary and Alternative Medicine", WHO, Geneva, 2005.
10. R. Bauer, Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved? *Drug Inf. J.*, **32**, 101-110 (1998).
11. J.B. Calixto, Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**(2), 179-189 (2000).
12. M.O. Nafiu, A.A. Hamid, H.F. Muritala, S.B. Adeyemi, Preparation, standardization, and quality control of medicinal plants in Africa, en: V. Kuete (editor), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Université de Dschang, Cameroon, 2017, pp. 171-207.
13. N. Sharapin, *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*, CYTED, Santa Fé de Bogotá, 2000.
14. M. Mosihuzzaman, M.I. Choudhary, Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine, *Pure Appl. Chem.*, **80**(10), 2195-2230 (2008).
15. K. Anupam, V. Garima, K. Roopak, Need of standardization of herbal medicines in modern era, *Int. J. Phytomed.*, **8**(3), 300-307 (2016).

16. A. Pandei, S. Tripathi, Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **2**(5), 115-119 (2014).
17. Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 30, NF 25, The United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2007, Vol. 2.
18. S. Lutoti, P. Okwany, C.O. Ajayi, J. Oloro, Formulation and standardization of herbal medicinal products: A review of the formulation considerations, quality control and safety of herbal products, *J. Pharm. Drug Res.*, **3**(3), 373-381 (2020).
19. World Health Organization (WHO), *Medicina tradicional: definiciones*. URL: [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/), Consultado en septiembre de 2019.
20. European Medicines Agency (EMA), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products*, EMA, London, 2018.
21. M. Wichtl, *Herbal Drugs Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart, 2004.
22. B. Lockwood, The quality of commercially available nutraceutical supplements and food sources, *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**(1), 3-10 (2011).
23. Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin. Med.*, **13**, 20 (2018).
24. A.R. Abubakar, M. Haque, Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **12**(1), 1-10 (2020).
25. Ministerio de Salud y protección Social, Decreto 2266, República de Colombia, Diario Oficial No. 45.610 (15 de julio de 2004).
26. Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 3553. República de Colombia, Diario Oficial No. 45.716 (29 de octubre de 2004).
27. Ministerio del Interior y de Justicia, Decreto 4927, República de Colombia, Diario Oficial No. 47566 (17 diciembre de 2009).
28. Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 1156, República de Colombia, Diario Oficial No. 50646 (6 de julio de 2018).

29. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, República Federativa de Brasil, (13 de maio de 2014).
30. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diretoria Colegiada Resolução - RDC N° 235, República Federativa de Brasil, Diário Oficial (20 de junho de 2018).
31. Ley General de Salud Reglamento de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, Artículos 17 bis, 17 bis 1, 17 bis 2, y reforma de los artículos 313, Estados Unidos Mexicanos, Diario Oficial de la Federación (13 de abril de 2004).
32. U.S. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), *Botanical Drug Development Guidance for Industry*, Department of Health and Human Services, Rockville MD, 2016.
33. A.Y. Saldarriaga, *Revisión crítica y análisis comparativo de los requerimientos normativos para la autorización de comercialización de productos naturales en diferentes países*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., 2014.
34. C.P. Nobre, F.N. Raffin, T.F. Moura, Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) by total flavonoids content determination, *Acta Farm. Bonaerense*, **24**(4), 562-566 (2005).
35. D.A.C. Cusinato, E.Z. Martinez, M.T.C. Cintra, G.C.O. Filgueira, A.A. Berretta, V.L. Lanchote, E.B. Coelho, Evaluation of potential herbal-drug interactions of a standardized propolis extract (EPP-AF®) using an *in vivo* cocktail approach, *J. Ethnopharmacol.*, **245**, 112174 (2019).
36. N.G. Bisset, Herbal drugs and phytopharmaceuticals, en: M. Wichtl (editor), *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 2004, pp. 337-339.
37. P. Chirag, S. Tyagi, P. Kanu, P. Tushar, P. Harnish, P. Priyanka, Standardization of Herbal Medicine: A Concise Review, *J. Pharm. Biol. Res.*, **2**(1), 97-101 (2014).
38. R.K. Bijauliya, S. Alok, D.K. Chanchal, M.A. Kumar, A comprehensive review on standardization of herbal drugs, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **8**(9), 3663-3677 (2017).

39. N.R. Ekka, K.P. Namdeo, P. Kumar, Standardization Strategies for Herbal Drugs-An Overview, *Res. J. Pharm. Technol.*, **1**(4), 310-312 (2008).
40. N.P. Yadav, V.K. Dixit, Recent approaches in herbal drug standardization, *Integr. Biol.*, **2**(3) 195-203 (2008).
41. S.C. Mishra, R. Panda, O.P. Rout, Importance and Scope of Standardization of Drugs in Indian Medicine, *Int. J. Pharm. Pharm. Res.*, **4**(1), 58-61 (2014).
42. European Medicines Agency (EMA), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Committee for medicinal products for human use (CHMP), Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), *Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products*, EMA, London, 2010, 18 p.
43. M. Heinrich, Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **80**(1), 62-66 (2015).
44. R. Kumar, M. Kotecha, A review on the standardization of herbal medicines, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **7**(2), 97-106 (2016).
45. World Health Organization (WHO), *Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection*, WHO, Geneva, 1996.
46. World Health Organization (WHO), *Quality control methods for herbal materials*, WHO, Geneva, 2011.
47. P. Hariharan, Medicinal plants and its standardization – A global and industrial overview, *Glob. J. Med. Plant. Res.*, **1**, 10-13 (2012).
48. S.G. Patil, A.S. Wagh, R.C. Pawara, S.M. Ambore, Standard tools for evaluation of herbal drugs: An overview, *Pharma. Innov.*, **2**(9), 60-65 (2013).
49. European Pharmacopoeia Council of Europe (Ph Eur). Ed. 8, *Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)*, Strasbourg, 2013, Vol. 2.
50. O. Camacho, *Contribución a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú) a escala de laboratorio*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, 2014.
51. Farmacopeia Brasileira, 5ª Ed., Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria y Fundación Oswaldo Cruz, Brasília, 2010, Vol. 2.

52. World Health Organization (WHO), *Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines*, WHO, Geneva, 2003.
53. C. Guerra, C. Alfaro, T. Palazón, Z. Ramos, R. Rodríguez, C. Cabezas, C. Acosta, M. Reyes, Desinfección química de plantas medicinales II: *Plantago lanceolata* L., *Rev. Cubana Plantas Med.*, **7**(3), 131-134 (2002).
54. P. Manzano, M. Quijano, I. Chóez, A. Barragán, R. Viteri, D. Martínez, C. Camacho, M. Miranda, Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves, *Rev. Fac. Nac. Agron.*, **71**(3), 8617-8622 (2018).
55. N. Choudhary, B.S. Singh, An overview of advances in the standardization of herbal drugs, *J. Pharm. Educ. Res*, **2**(2) 55-70 (2011).
56. A. Bandoni, Evaluación farmacopeica de la calidad de drogas vegetales y productos relacionados. Estado actual en las farmacopeas argentina y brasilera, *Dominiguezia*, **27**(2) 35-56 (2011).
57. H. Cabrera, F. Morón, M. Amador, A. García, L. Acosta, Phytochemical composition of fresh aerial parts of *Phania matricarioides*, *Rev. Cubana Plantas. Med.*, **17**(3) 268-278 (2012).
58. P. Nikam, J. Kareparamban, A. Jadhav, V. Kadam, Future trends in standardization of herbal drugs, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2**(6), 38-44 (2012).
59. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), *Guideline on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Substances, Herbal Preparations, and Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products*, EMA, London, 2011.
60. K. Meza, G. Geoconda, *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus) (DC) STAPE, Poacea en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica*, Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, 2013.
61. O.G. Bhusnure, S. Suryawanshi, S. S. Vijayendra, S.B. Gholve, P.S. Girm, M.J. Birajdar, Standardization and quality evaluation of herbal drugs, *J. Drug. Deliv. Ther.*, **9**(3), 1058-1063 (2019).
62. D.G. Watson, *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Elsevier, Glasgow, 1999.



63. B. Archana, K. Anubha, Standardization of herbal drugs: An overview, *Int. Res. J. Pharm.*, **2**(12), 56-60 (2011).
64. K. Das, R.K.S. Tiwari, D.K. Shrivastava, Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends, *J. Med. Plant. Res.*, **4**(2) 104-111 (2010).
65. M. Bimakr, R.A. Rahman, F.S. Taip, A. Ganjloo, L.M. Salleh, J. Selamat, I.S.M. Zaidul, Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, *Food Bioprod. Process*, **89**, 67-72 (2011).
66. S.S. Belokurov, I.A. Narkevich, E.V. Flisyuk, I.E. Kaukhova, M.V. Aroya, Modern extraction methods for medicinal plant raw material (Review), *Pharm. Chem. J.*, **53**(6) 559-563 (2019).
67. A. Arceusz, M. Wesolowski, P. Konieczynski, Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review, *Nat. Prod. Commun.*, **8**(12), 1821-1829 (2013).
68. A. Gupta, M. Naraniwal, V. Kothari, Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts, *Int. J. Appl. Nat. Sci.*, **1**, 8-26 (2012).
69. H. Olivo, M. Parra, *Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpink, Ocotea quixos (Lam.) kostern*, Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, 2017.
70. A.J. Harborne, *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, New York, 1998.
71. P.H. List, P.C. Schmidt, *Phytopharmaceutical Technology*, Hyden & Son Limited, London, 1989.
72. K. Patra, S. Pareta, R. Harwansh, J. Kumar, Traditional approaches towards standardization of herbal medicines, *J. Pharm. Sci. Technol.*, **2**(11), 372-379 (2010).
73. J.N. Eloff, D.T. Ntloedibe, R. van Brummelen, A simplified but effective method for the quality control of medicinal plants by planar chromatography, *Afr. J. Tradit., Complement Altern. Med.*, **8**(5), 1-12 (2011).
74. R. Braz, L.G. Wolf, G. Lopes, J.C. Mello, Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **22**(5), 1111-1118 (2012).

75. J.L. De Souza, W.V. Da Silva, I. Ferraz, M. Assunção, L. Lira, Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil, *Pharmacogn. Mag.*, **14**(56), 437-443 (2018).
76. S. Niharika, P. Manchikanti, S. Dey, Herbal drugs: Standards and regulation, *Fitoterapia*, **81**(6), 462-471 (2010).
77. M. Rajani, N. Kanaki, Phytochemical standardization of herbal drugs and polyherbal formulations, en: K. Ramawat, J. Merillon (editors), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer, Berlin, 2008, pp. 349-369.
78. N.J. Lazarowych, P. Pekos, Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products, *Drug. Inf. J.*, **32**(2), 497-512 (1998).
79. D.A. Frommenwiler, A. Booker, R. Vila, M. Heinrich, E. Reich, S. Cañigüeral, Comprehensive HPTLC fingerprinting as a tool for a simplified analysis of purity of ginkgo products, *J. Ethnopharmacol.*, **243**, 112084 (2019).
80. R. Aburrá, *Evaluación y control de los impactos generados por sustancias y residuos no convencionales*, C.I.S.A. Grupo Editorial Encuentro, Córdoba, 2007.
81. D. Marcano, M. Hasegawa, *Fitoquímica orgánica*, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, 2002.
82. A. Blainski, T. Antonelli-Ushirobira, G. Godoy, E. Leite-Mello, J. Mello, Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for galocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium Brasiliense*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **27**(2) 162-169 (2017).
83. International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of analytical procedures: Methodology, ICH-Q2B*, ICH, Geneva, 1996.
84. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods*, FDA, Rockville, 1994.
85. G. Szepesi, M. Gazdag, K. Mihályfi, Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. III. Method validation, *J. Chromatogr.*, **464**(2), 265-278 (1989).

86. E. Montpart, P. Martín, Las Conferencias Internacionales de Armonización y el *Common Technical Document* (ICH - CTD), *OFFARM*, **22**, 118-126 (2003).
87. V. Ravichandran, S. Shalini, K. Sundram, R. Harish, Validation of analytical methods-Strategies & importance, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2**(3), 18-22 (2010).
88. World Health Organization (WHO), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, WHO, Geneva, 2005.
89. R. Rathod, R.R. Chandak, Review on “Standardization an Important Tool for Herbal Drug Development”, *J. Drug. Deliv. Ther.*, **9**(6), 253-257 (2019).
90. N.H. Anderson, Photostability testing: Design and interpretation of tests on drug substances and dosage forms, en: H.H. Tonnersons (editor), *The Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor & Francis, London, 1996, pp. 305–321.
91. L. Thakur, U. Ghodasra, N. Patel, M. Dabhi, Novel approaches for stability improvement in natural medicines, *Pharmacogn. Rev.*, **5**(9), 48-54 (2011).
92. T. Rawat, I.P. Pandey, Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations, *J. Pharm. Sci. & Res.*, **7**(5), 238-241 (2015).
93. World Health Organization (WHO), *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, WHO, Geneva, 2017.
94. G. Bansal, N. Suthar, J. Kaur, A. Jain, Stability testing of herbal drugs: Challenges, regulatory compliance and perspectives, *Phytother. Res.*, **30**(7), 1046-1058 (2016).
95. S.K. Baveja, S. Singh, Thin-layer chromatographic examination of the degradation of centbucridine in aqueous solutions, *J. Chromatogr.*, **396**, 337-344 (1986).
96. S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, *Pharm. Technol.*, **4**, 1-14 (2000).

### COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

W.L. Villarreal-Romero, J.E. Robles-Camargo, G.M. Costa, Estado del arte en la estandarización de extractos vegetales, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 842-867 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110745>

## Factores relacionados con la adherencia al tratamiento en pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles en tres ciudades colombianas

Dora Inés Molina de Salazar<sup>1,2a</sup>, Miguel Urina Triana<sup>1,3b</sup>, Jazmín Abuabara-Turbay<sup>1c</sup>, Tatiana Espinoza-Espitia<sup>1d</sup>, Armando Flores-Ramírez<sup>4e</sup>, Álvaro Vallejos-Narváez<sup>5f</sup>, Gloria Castro<sup>5g</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

<sup>2</sup>Asociación IPS Internistas de Caldas, Manizales, Colombia.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia.

<sup>4</sup>VIAR Consulting, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>5</sup>Megalabs Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

Correos electrónicos:

<sup>a</sup>doraines56@gmail.com, <sup>b</sup>murina1@unisimonbolivar.edu.co, <sup>c</sup>yatur20@hotmail.com,

<sup>d</sup>espinosatati@yahoo.com, <sup>e</sup>direccioncomercial@viarconsuting.com,

<sup>f</sup>avallejos@megalabs.com.co, <sup>g</sup>gcastro@megalabs.com.co

\*Autora de correspondencia

Recibido: 24 de noviembre de 2022

Revisado: 29 de marzo de 2023

Aceptado: 4 de mayo de 2023

### RESUMEN

**Objetivo:** identificar y evaluar problemas relacionados con la adherencia al tratamiento en pacientes con enfermedades no transmisibles (ENT) mediante algunas actividades de seguimiento farmacoterapéutico (SFT) utilizando la metodología Dáder. **Métodos:** estudio prospectivo de corte transversal en sujetos  $\geq 18$  años con ENT de 3 ciudades de Colombia. Se recolectaron los datos de utilización de medicamentos mediante una encuesta virtual. Se utilizó la metodología Dáder de SFT y se clasificaron los problemas relacionados con el medicamento (PRM) y resultados negativos a la medicación (RNM) según el Tercer Consenso de Granada. Adicionalmente, se evaluó la adherencia mediante el Test de cumplimiento The Medication

Adherence Questionnaire (SMAQ) y los criterios de STOPP/START en los adultos mayores. Se realizó un análisis descriptivo de los datos y con la prueba Chi-cuadrado de Pearson se evaluó la asociación entre la adherencia y el género o edad. **Resultados:** se evaluaron 112 sujetos con predominio del género femenino (72.3%) y edad media de  $60.2 \pm 10.9$ . Los diagnósticos principales más frecuentes fueron hipertensión arterial (58.9%) y diabetes mellitus tipo 2 (36.6%). La mediana de medicamentos por paciente fue 5 con un rango intercuartílico (RIQ) de 3-7. El 7.25% fue no adherente y la mayoría de las veces la causa fue atribuible al paciente. No se encontró relación entre la adherencia y el género o grupo etario. Se encontraron 51 PRM y 51 RNM con propuestas para resolverlos. **Conclusión:** la evaluación de la adherencia farmacológica a través de programas de SFT muestra utilidad en el manejo de los pacientes con ENT.

**Palabras claves:** Adherencia a la medicación, seguimiento farmacoterapéutico, enfermedad cardiometabólica, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2.

## SUMMARY

### Factors related to adherence to treatment in patients with chronic noncommunicable diseases in three Colombian cities

**Aim:** To present the preliminary report of the implementation of a pharmacotherapeutic follow-up (PF) program designed to improve the adherence of patients with chronic non-communicable diseases (NCDs) using the *Dáder* methodology. **Methods:** prospective cross-sectional study in subjects  $\geq 18$  years with NCDs in 3 cities from Colombia. Data on the use of medications were collected through a virtual survey. The *Dáder* methodology was used, and the drug-related problems (DRP) and negative outcomes associated with medication (NOM) were classified according to the Granada Third Consensus. Additionally, adherence was assessed using The Medication Adherence Questionnaire (SMAQ) and the STOPP-START criteria were evaluated among the elder adults. Data was analyzed by descriptive statistics and the association between adherence and gender or age by Pearson's chi-squared test was evaluated. **Results:** One hundred twelve subjects were evaluated with a predominance of female gender (72.3%) and mean age of  $60.2 \pm 10.9$ . The most encountered diagnoses were hypertension (58.9%) and type 2 diabetes mellitus (36.6%). Median number of medications per patient was 5 whit the interquartile range (IQR) 3-7. Non-adherence was identified in 7.25% and the main reason was

attributable to the patient by 90%. No association between adherence and gender or age group was identified. Fifty-one DRP and 51 NOM were found with proposals to solve them. **Conclusion:** The evaluation of pharmacological adherence through PF programs shows utility in the management of patients with NCDs.

**Keywords:** Adherence to medication, pharmacotherapeutic follow-up, cardiometabolic diseases, arterial hypertension, diabetes mellitus type 2.

## RESUMO

Fatores relacionados à adesão ao tratamento em pacientes com doenças crônicas não transmissíveis em três cidades colombianas

**Objetivo:** identificar e avaliar problemas relacionados à adesão ao tratamento em pacientes com doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) por meio de algumas atividades de acompanhamento farmacoterapêutico (SFT) utilizando a metodologia Dáder. **Métodos:** estudo transversal prospectivo em indivíduos  $\geq 18$  anos com DNTs de 3 cidades colombianas. Os dados de utilização de medicamentos foram coletados por meio de uma pesquisa virtual. A metodologia SFT Dader foi utilizada e os problemas relacionados com drogas (DRP) e resultados negativos de drogas (NDR) foram classificados de acordo com o Terceiro Consenso de Granada. Além disso, a adesão foi avaliada por meio do teste de conformidade Medication Adherence Questionnaire (SMAQ) e os critérios STOPP/START em adultos mais velhos. Foi realizada análise descritiva dos dados e a associação entre adesão e sexo ou idade foi avaliada com o teste Qui-quadrado de Pearson. **Resultados:** foram avaliados 112 sujeitos com predominância do gênero feminino (72.3%) e idade média de  $60.2 \pm 10.9$  anos. Os diagnósticos principais mais frequentes foram hipertensão arterial (58.9%) e diabetes mellitus tipo 2 (36.6%). O número mediano de medicamentos por paciente foi de 5 com intervalo interquartil (IQR) de 3-7. 7.25% eram não aderentes e na maioria das vezes a causa era atribuível ao paciente. Não foi encontrada relação entre adesão e sexo ou faixa etária. Foram encontrados 51 PRM e 51 RNM com propostas para os resolver. **Conclusão:** a avaliação da adesão farmacológica por meio de programas SFT mostra utilidade no manejo de pacientes com DCNT.

**Palavras-chave:** Adesão medicamentosa, acompanhamento farmacoterapêutico, doença cardiometabólica, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2.

## INTRODUCCIÓN

La no adherencia al tratamiento farmacológico se ha asociado a desenlaces no deseados, especialmente en sujetos con enfermedades cardiovasculares [1, 2]. A pesar de esto, se ha identificado una alta proporción de pacientes con hipertensión arterial (HTA) no adherentes al manejo farmacológico con una prevalencia de hasta el 45.2% en un meta-análisis reciente [3]. Esto también es cierto en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), donde la adherencia a la medicación varía entre 38.5 a 93.1% [4]. Dentro de los factores asociados al no cumplimiento a la medicación, se han mencionado aquellos relacionados al paciente, la terapia, el sistema de salud o a la patología de base [5].

Se han descrito estrategias llevadas a cabo por farmacéuticos que han sido efectivas para mejorar la adherencia y el control glicémico en paciente con diabetes, indicando el papel de estos profesionales en el tratamiento global de estos sujetos [6]. Por otra parte, se han desarrollado programas de seguimiento farmacoterapéutico (SFT) que han sido importantes para evaluar los problemas relacionados con el tratamiento de una forma más objetiva y así mejorar los resultados de la terapia [7-9]. Estos han sido realizados en sujetos con enfermedades crónicas donde la HTA, DM2, obesidad y dislipidemia están presentes [8, 10].

En Latinoamérica recientemente se realizó una revisión sistemática por Guzmán-Tordecilla *et al.*, evaluando las intervenciones para mejorar la adherencia farmacológica en pacientes con HTA concluyendo que estas intervenciones varían a lo largo del continente y que se requieren intervenciones costo-efectivas para mejorar esta problemática [11]. A su vez, en Colombia no son muchos los programas de seguimiento farmacoterapéutico (SFT) personalizado y su implementación requiere de un grupo multidisciplinario conformado por profesionales de salud de diferentes áreas y de metodologías apropiadas como por ejemplo el método *DADER* que ha demostrado tener éxito en otras latitudes [10]. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es identificar y evaluar problemas relacionados con la adherencia al tratamiento en pacientes con enfermedades no transmisibles (ENT) mediante algunas actividades de seguimiento farmacoterapéutico (SFT) utilizando la metodología *Dáder*.

## METODOLOGÍA

### Diseño del estudio y elección de participantes

Se realizó un estudio observacional prospectivo de corte transversal en sujetos adultos atendidos en la consulta externa de medicina interna de miembros de la Asociación

Colombiana de Medicina Interna [ACMI]) en los departamentos de Bolívar, Córdoba y Caldas durante el período comprendido entre septiembre y diciembre de 2020. Los criterios de inclusión fueron: sujetos con edad  $\geq 18$  años y que padecieran alguna de las siguientes enfermedades o condiciones: HTA, DM2, dislipidemia, hipotiroidismo, insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas, tratamiento anticoagulante, coronariopatía y cardiopatía isquémica, antecedente de enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, aterosclerosis subclínica, obesidad o síndrome metabólico. Se excluyeron a aquellos sujetos que no otorgaran su consentimiento, que no tuvieran la accesibilidad a contactos telefónicos o que no tuvieran disponibilidad o deseo de continuar controles con el mismo médico.

### **Obtención de los datos y variables estudiadas**

Se contó con la participación de una Químico-Farmacéutica quien realizó encuestas virtuales para la recolección de la información y en tiempo real se registraron los datos en una plataforma diseñada para tal efecto; utilizando esta, para el análisis de la medicación de cada uno de los pacientes con el fin de identificar PRM y RNM. Se obtuvo información sobre las siguientes variables: demográficas (edad, género, etnia, procedencia, nivel educativo), diagnóstico principal, número/tipo de medicamentos, peso, talla, presencia de cuidador y su rol en el cuidado del sujeto. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) con los datos de peso y talla y posteriormente se clasificó según la clasificación de la Organización Mundial de Salud [12].

### **Evaluación de la adherencia al tratamiento**

Para la evaluación de la adherencia se utilizaron las siguientes preguntas, expuestas por Test de cumplimiento SMAQ (ver anexo): *¿Alguna vez olvida tomar la medicación?, ¿Toma siempre los fármacos a la hora indicada?, ¿Alguna vez deja de tomar los fármacos si se siente mal?, ¿Olvidó tomar la medicación durante el fin de semana?, ¿En la última semana cuántas veces no tomó alguna dosis?, ¿Desde la última visita cuántos días completos no tomó la medicación?* Con estas preguntas se clasificó el paciente en adherente o no adherente y se evaluaron también las causas de la no adherencia, si esta dependía del paciente, era una causa administrativa u otra.

### **Método Dáder de Seguimiento Farmacoterapéutico**

La metodología *Dáder* fue diseñada por el Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica de la Universidad de Granada para el seguimiento farmacoterapéutico y está basado en la obtención de la historia farmacoterapéutica del paciente, evaluación del estado de situación, identificación de las sospechas de problemas relacionados con los medicamentos, intervención farmacéutica y evaluación de los resultados obtenidos



[7, 13]. En el presente estudio se analizó la información farmacoterapéutica obtenida y se comunicaron los problemas relacionados con el medicamento (PRM) y los resultados negativos a la medicación (RNM) identificados a los médicos tratantes, de acuerdo al Tercer Consenso de Granada [14].

### **Criterios STOPP/START**

A todos los sujetos participantes > 62 años se les aplicaron los criterios STOPP/START [15] que son las siglas de *Screening Tool of Older Person's Prescriptions/Screening Tool to Alert doctors to Right Treatment*, estos fueron por primera vez dados a conocer en el 2008 [16], y avalados por la Sociedad *Europea de Geriatria*. Se utilizaron para describir los errores de omisión y de tratamiento más frecuentes en la prescripción de adultos mayores [15].

### **Análisis estadístico**

Los datos de la encuesta virtual fueron extraídos a través de Microsoft Excel. Se realizó un análisis descriptivo de las variables, se utilizaron valores absolutos y porcentajes para las variables categóricas, se calculó mediana y rango intercuartílico para la variable continua número de medicamentos que toma el sujeto; las demás variables continuas se expresaron mediante la media y desviación estándar. Se utilizó la prueba Chi-cuadrado de *Pearson* para comprobar si el nivel de adherencia dependía del sexo o de la edad, se consideró estadísticamente significativo a una  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS para Mac (Versión 26).

### **Consideraciones éticas**

El protocolo de investigación y el informe de consentimiento fueron aprobados por el Comité Regional de Ética en Investigación Clínica del Eje Cafetero-CREICEC. Todos los sujetos incluidos dieron su consentimiento para participar en el presente estudio.

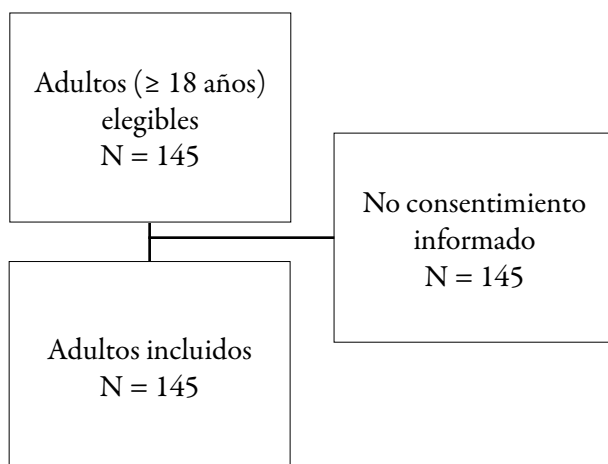
## **RESULTADOS**

### **Características generales**

Se seleccionaron 112 sujetos de acuerdo con los criterios de inclusión de 145 sujetos elegibles (Figura 1). El 72.3% fueron mujeres, la edad media fue de  $60.21 \pm 10.93$  años con un rango de edad distribuido principalmente entre los 36-62 años (58,9%) (Tabla 1). De acuerdo con la clasificación de patologías, las dos enfermedades más frecuentes fueron HTA (58.9%) y DM2 (36.6%). El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de  $27.69 \pm 5.22$  mostrando sobrepeso en el 45% y obesidad en el 25.6% de los sujetos

estudiados. El nivel educativo estuvo principalmente representado por el nivel primario con el 26.8% y secundario el 33.9%. El 35% de los sujetos eran afrodescendientes y un 5.4% indígenas. El 92.9% eran pertenecientes al Departamento de Bolívar (Tabla 1).

**Figura 1.** Flujograma de sujetos incluidos en estudio



**Tabla 1.** Características de la población en estudio (N = 112)

Población total	N = 112
<b>Género (n [%])</b>	
Masculino	31 (27.7)
Femenino	81 (72.3)
Edad (años, media ± DE)	60.21 ± 10.933
<b>Rango de edad (n [%])</b>	
Adulto joven (25-35 años)	3 (2.7)
Adulto (36-62 años)	66 (58.9)
Adulto mayor (>62 años)	43 (38.4)
Peso (kg, media ± DE) *	73.23 ± 14.916
Talla (m, media ± DE) *	1.6260 ± .08832
IMC (kg/m <sup>2</sup> , media ± DE) *	27.69 ± 5.220
Bajo peso (<18.5; n [%])	1 (1.2)
Peso normal (18.5 – 24.9; n [%])	24 (27.9)
Sobrepeso (25 – 29.9; n [%])	39 (45.3)
Obesidad (≥ 30; n [%])	22 (25.6)

(Continúa)

Población total	N = 112
<b>Diagnóstico principal (n [%])</b>	
Hipertensión arterial	66 (58.9)
Diabetes mellitus	41 (36.6)
Arritmia cardiaca	2 (1.8)
Antecedentes de ACV	1 (0.9)
Hipotiroidismo	1 (0.9)
Insuficiencia Cardiaca	1 (0.9)
<b>Nivel educativo (n [%])</b>	
Primaria	30 (26.8)
Secundaria	38 (33.9)
Técnico o tecnólogo	9 (8)
Profesional	3 (2.7)
No contestó	32 (28.6)
<b>Etnia (n [%])</b>	
Indígenas	6 (5.4)
Afrodescendientes	40 (35.7)
Otras	66 (58.9)
<b>Procedencia</b>	
Bolívar	104 (92.9)
Córdoba	7 (6.3)
Caldas	1 (0.9)
<b>Régimen de afiliación al SGSSS</b>	
Contributivo	112 (100)

\*Peso, talla e IMC fue calculado con población total N = 86 debido a datos no informados. Abreviaciones: ACV: Accidente cerebrovascular, DE: Desviación Estándar, IMC: Índice de Masa Corporal, SGSSS: Sistema General de Seguridad Social.

### Características de las medidas farmacológicas y no farmacológicas

El 50% de la población recibió de 3 a 7 medicamentos, con una mediana de 5 medicamentos por cada individuo, el 42.85% de los sujetos se encontraban polimedicados. Los fármacos más formulados pertenecían al grupo de los antihipertensivos seguidos de los hipoglucemiantes (insulina e hipoglucemiantes orales) y en tercer lugar las estatinas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de las medidas farmacológicas y no farmacológicas de la población en estudio (N= 112)

Población total		N = 112	
Medicamentos por individuo (mediana, RIQ)		5 (3-7)	
Número de medicamentos que toma el sujeto		n	%
1		1	0.9
2		9	8.04
3		9	8.04
4		23	20.53
5		22	19.64
6		27	24.1
7		9	8.04
8		6	5.35
9		3	2.68
10		3	2.68
ATC	Tipo de medicamentos	n	n total
	<b>Antihipertensivos</b>		237
C09	ARAS	87	
C03	Diuréticos	46	
C07	Betabloqueadores	39	
C08	Calcios antagonistas	41	
C02	Acción central	14	
C09	IECAS	10	
	<b>Estatinas</b>		91
C10	Atorvastatina	81	
C10	Rosuvastatina	5	
C10	Lovastatina	4	
C10	Ezetimiba y Simvastatina	1	
	<b>Antiácidos</b>		76
A02	Esomeprazol	40	
A02	Omeprazol	25	
A02	Hidróxido aluminio	11	
A10	<b>Hipoglucemiantes orales</b>	63	63
A10	<b>Insulina</b>	43	43
	<b>Antiagregantes</b>		48
B01	ASA	46	
B01	Clopidrogel	2	
	<b>Anticoagulantes</b>		3
B01	Warfarina	2	
B01	Apixaban	1	
H03	<b>Levotiroxina</b>	5	5
	<b>Otros†</b>	12	12
<b>Total</b>			<b>578</b>

(Continúa)

Medidas no farmacológicas		n	%
Dieta	Si	56	50
	No	56	50
Ejercicio	Si	88	78.6
	No	24	21.4

†Incluye ácido fólico (n=3), prednisolona (= 3), carbonato de calcio (n=2), quetiapina (n=1), sulfato ferroso (n=1), risperidona (n=1), montelukast (n = 1).

### Evaluación de adherencia

En la Tabla 3, se presenta el análisis de la adherencia, el 92.75% fue adherente y el 7.25% no adherente, la principal razón de la no adherencia fue atribuible al paciente en un 90%.

**Tabla 3.** Análisis del Test de Adherencia (N = 138)\*

	Si (n [%])	No (n [%])
¿Alguna vez olvida tomar la medicación?	9 (6.52)	129 (93.48)
¿Toma siempre los fármacos a la hora indicada?	119 (86.23%)	19 (13.77)
¿Alguna vez deja de tomar los fármacos si se siente mal?	20 (14.49)	118 (85.51)
¿Olvidó tomar la medicación durante el fin de semana?	5 (3.62)	133 (96.38)
	<b>Número de sujetos que dejo de tomar alguna (n [%])</b>	<b>Número de sujetos que siempre la tomaron (n [%])</b>
¿En la última semana cuántas veces no tomó alguna dosis?	5 (3.62)	133 (96.38)

	Si (n [%])	No (n [%])
	<b>Número de sujetos con días completos sin medicación (n [%])</b>	<b>Número de sujetos que siempre la tomaron (n [%])</b>
<b>¿Desde la última visita cuántos días completos no tomó la medicación?</b>	8 (5.8)	130 (94.2)
<b>Clasificación adherencia</b>	<b>Adherente (n [%])</b>	<b>No Adherente (n [%])</b>
	128 (92.75)	10 (7.25)
<b>Razón a la no adherencia</b>	<b>Atribuidas al Paciente (n [%])</b>	<b>Causas Administrativas (n [%])</b>
	9 (90)	1 (10)

\*Se realizaron 138 test de adherencia a 112 sujetos.

Con relación a la adherencia no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el no adulto mayor y el adulto mayor. (Chi-Cuadrado: 0.374, p=0.829) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Edad, Género y Adherencia (N=112)

	Adherencia		
	Si	No	Total
<b>Edad<sup>1</sup></b>			
25-62 años	64	5	69
>62 años	39	4	43
Total	103	9	112
<b>Género<sup>2</sup></b>			
Masculino	30	1	31
Femenino	73	8	81
Total	103	9	112

<sup>1</sup>Rango de edad y adherencia: Chi cuadrado: 0.373, p=0.829

<sup>2</sup>género y adherencia: Chi-cuadrado de Pearson: 1.342, p=0.247

Los criterios *STOPP/START* fueron aplicados a los 43 sujetos >62 años, encontrando que el 60.5% (n=26) no los cumplen (16 mujeres (61.5%) y 10 hombres (38.5%)). Setenta y dos sujetos (64.28%) tuvieron un nivel alto de introspección de la enferme-

dad, 35 nivel medio (31.25%) y solo 5 tuvieron un nivel bajo (4.64%). Con relación a el nivel de introspección del uso de medicamentos, fue alto en 71 (63.33%), medio en 30 (26.78%) y bajo en 11 (9.82%). No se encontró una diferencia significativa al analizar el nivel de introspección de la enfermedad y el de medicamentos con relación al diagnóstico de la enfermedad principal del sujeto con un Chi-cuadrado:11.962 y  $p=0.288$  y Chi-cuadrado:10.444 y  $p=0.402$ , respectivamente.

### Problemas Relacionados con Medicamentos y Resultados Negativos asociados a la Medicación

Se identificaron 51 problemas relacionados con el medicamento (PRM), en la tabla 5 se muestran hacia quien fueron dirigidas las intervenciones para su corrección.

**Tabla 5.** Clasificación de los problemas relacionados con el medicamento (PRM) encontrados y a quién se dirigieron las intervenciones propuestas (N=51)

Sujeto a quien se dirigió el posible plan de acción						
Clasificación	PRM	Médico	ND	Operador logístico	Paciente y/o cuidador	Cantidad Total
Calidad	Características personales				1	1
Disponibilidad	Incumplimiento			5		5
Otro	otros	2				2
Prescripción	Duplicidad	11				11
	Dosis, pauta y/o duración no adecuada	2		1	2	5
	Contraindicación	3				3
Salud	Interacción	16				16
	Probabilidad de efectos adversos	3	1			4
	Otros problemas de salud que afectan al tratamiento	3				3
	Causa administrativa que limita el acceso a medicamentos	1				1
<b>Total</b>		<b>41</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>51</b>

Nd: No disponible

En la tabla 6, observamos los resultados negativos a la medicación (RNM) y que actividad se propuso para poder resolver los PRM de acuerdo con su tipo.

**Tabla 6.** Resultado Negativos asociados a la Medicación (RNM) y actividad propuesta a desarrollar (N=51)

Tipo de RNM	RNM	Actividad por desarrollar para resolver PRM	Cantidad
Efectividad	Inefectividad no cuantitativa	Educar al paciente sobre adherencia al tratamiento, la forma de uso y la administración del medicamento	2
		Evaluar ajuste de Dosis	1
		Evaluar beneficio/riesgo del tratamiento	1
		Monitorizar	1
Necesidad	Efecto de medicamento innecesario	Retirar un medicamento	3
		Sugerir o ajustar farmacoterapia	1
	Problema de Salud No Tratado	Otro	6
		Educar al paciente sobre adherencia al tratamiento, la forma de uso y la administración del medicamento	1
Seguridad	Inseguridad Cuantitativa	Evaluar ajuste de dosis	2
		Monitorizar	1
	Inseguridad No cuantitativa	Evaluar beneficio/riesgo del tratamiento	13
		Sugerir ajuste a la farmacoterapia	7
		Monitorizar	5
		Evaluar por parte del médico la sintomatología clínica	2
		No disponible	1
		Reemplazar un medicamento	1
		Retirar un medicamento	1
		Evaluar ajuste de dosis	1
		Sugerir una opción terapéutica diferente	1
Total	51		

### Características del cuidador

En el estudio encontramos que el 32.1% (n=36) de los sujetos tenía un cuidador con una edad promedio de  $42.89 \pm 15.61$ . El 94.4% (n=34) era un familiar y el rango de edad mostró que un 19.4% (n=7) tenía cuidadores adultos mayores (>62 años) y un 8.3% (n=3) menores de edad (<18 años), 25% (n=9) entre 18-24 años, 8.3% (n=3) entre 25 -35 años, y el 38.9 % (n=14) entre 36-62 años. El 66.7% (n=24) estaba encargado de la salud del paciente y de administrarles sus medicamentos.



## DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó a un grupo de adultos con enfermedades crónicas no transmisibles, principalmente HTA y DM2, en el contexto de un programa de seguimiento farmacoterapéutico. Se analizaron sus características demográficas, medidas farmacológicas, adherencia a las mismas, los problemas relacionados con medicamentos y los resultados negativos asociados a la medicación.

En cuanto a la adherencia a la medicación, esta fue de 92.75% de los sujetos analizados. Estudios previos han demostrado distintas tasas de adherencias en otras latitudes [17]. Selcuk *et al.* realizaron un estudio en Turquía en 418 sujetos adultos con HTA, encontrando una tasa de adherencia a la medicación del 78.2%, pero con menor adherencia al tratamiento no farmacológico (dieta, actividad física, cesación del tabaquismo) [17]. Adicionalmente, Krass *et al.*, en una revisión sistemática de 27 estudios, describieron que la prevalencia de adherencia a la medicación en sujetos con DM2 variaba entre 38.5% y 93.1% [4]. Por último, el estudio CAPS en España, evaluó la adherencia al tratamiento farmacológico en pacientes con antecedente de algún evento cardiovascular, encontrándose una prevalencia de adherencia del 45.8% de los individuos estudiados [18]. El análisis de no-adherencia en nuestro estudio mostró que el 90% de las causas fueron atribuibles al paciente, el 10% de sujetos restantes presentaron problemas atribuidos a causas administrativas que limitaron el acceso a los medicamentos. Espeche *et al.* analizaron 852 participantes en un estudio multicéntrico en Argentina, encontrando que las principales razones para la no adherencia del manejo antihipertensivo fueron el olvido de la toma de medicamentos y los errores al momento de la toma. También describieron que aquellos sujetos con más factores de riesgo cardiovascular como tabaquismo, diabetes mellitus, dislipidemia y episodios cardiovasculares previos tenían menor adherencia [19]. Adicionalmente, la adherencia también está en función del número de fármacos que un sujeto toma. Tavares *et al.* analizaron los factores asociados a una pobre adherencia en una encuesta de uso de medicamentos en Brasil, encontrando que los sujetos que tomaban  $\geq 5$  medicamentos tenían 2.4 veces más probabilidad de tener una baja adherencia en comparación con aquellos que consumían un solo medicamento [20], en nuestro estudio el 42.8% de los sujetos recibía más de 5 fármacos y el 50% de la población recibió de 3 a 7 medicamentos.

Se identificaron los problemas relacionados con el medicamento, así como los resultados negativos asociados a la medicación con su respectiva propuesta a desarrollar para resolverlo. Un estudio realizado en nuestro país evaluando un programa SFT en el control de los sujetos con DM2, no demostró un aumento en la efectividad de la terapia antidiabética pero sí identificó una reducción en los costos de la atención sanitaria y resaltó la importancia de identificar los resultados negativos a la medicación [21].

En nuestro estudio también se evaluó la presencia o no de un cuidador y sus características. Se encontró que la tercera parte de los sujetos tenía un cuidador, que en el 94.4% era un familiar y llamó la atención que el 27.7% de estos eran adultos mayores o menores de edad. Es muy importante tener en cuenta quien debe ser un cuidador ideal y cuál es su responsabilidad en el cuidado, particularmente en pacientes adultos mayores. El 66.7% de los cuidadores en el estudio estaba encargado de la salud y de la administración de los fármacos. En un estudio en Cartagena, Colombia, se evaluaron las características de los cuidadores con enfermedad crónicas, encontrándose, entre ellas, un predominio del género femenino y bajo nivel socioeconómico. Adicionalmente, describen una proporción similar en cuanto al grupo etario (< 35 y >35 años) [22].

Es importante identificar las estrategias adecuadas para mejorar la adherencia de las medidas farmacológicas y no farmacológicas. Estas estrategias deben tener un amplio enfoque en distintos ángulos (multimodales) ya que las razones para no ser adherente son multifactoriales [23]. Recientemente, Xu *et al.* reflexionan sobre las estrategias “*a la medida*” en las cuales se debe primero identificar a los individuos no adherentes (con una herramienta idónea para este fin), para posteriormente identificar las barreras para este problema y así proponer soluciones dirigidas según lo encontrado [24]. Las medidas que mejoren la adherencia en pacientes con enfermedades cardiovasculares van a tener impacto en mejorar los desenlaces en salud y así mismo reducir los costos asociados [25].

### Limitaciones

Las siguientes limitaciones son importantes de mencionar al analizar nuestros resultados. En nuestro estudio solo se evaluó la adherencia al tratamiento farmacológico en una visita inicial, se requieren de más visitas y seguimiento para una mejor evaluación de la adherencia y del seguimiento farmacoterapéutico. No se evaluó la prescripción del ejercicio o la dieta ni la adherencia a estas medidas no farmacológicas que son de importancia en el manejo de las enfermedades crónicas. Adicionalmente, solo se midió el nivel de adherencia, pero no se evaluó la efectividad del tratamiento. Por último, la muestra incluye predominantemente sujetos de un departamento de Colombia, se requieren estudios en múltiples ciudades y centros para evaluar la implementación y efectividad de los programas de seguimiento farmacoterapéutico en el país.

## CONCLUSIONES

La evaluación de la adherencia farmacológica en sujetos portadores de enfermedades crónicas no transmisibles, mediante algunas actividades de seguimiento farmacoterapéutico de la metodología Dáder, es un punto de partida en la identificación de PRM y RNM en los pacientes portadores ENT. Los programas de SFT con grupos multidiscipli-

plinarios pueden ser una herramienta útil en Colombia para monitorear regularmente a los pacientes y así evaluar su adherencia a las modalidades de tratamiento, conocer las causas de no adherencia y promover estrategias para evitarla. En este reporte, se mostró un nivel adecuado de adherencia y su utilidad para continuar la iniciativa de una Asociación Médica para implementar y extender estos programas con el objetivo de promover el tratamiento eficaz y mejorar la adherencia de los sujetos con enfermedades crónicas no transmisibles en Colombia, como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial y la obesidad. Se requieren estudios multicéntricos con mayor tamaño de muestra para comparar con nuestros hallazgos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo reconocen y agradecen Asociación Colombiana de Medicina Interna (ACMI).

### CONFLICTOS DE INTERÉS

La presente investigación fue financiada por Megalabs Colombia.

### REFERENCIAS

1. P.M. Ho, C.L. Bryson, J.S. Rumsfeld, *Circulation*, **119**(23), 3028-3035 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.768986>
2. M.A. Chisholm-Burns, C.A. Spivey, The “cost” of medication nonadherence: Consequences we cannot afford to accept, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **52**(6), 823-826 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1331/JAPhA.2012.11088>
3. T.M. Abegaz, A. Shehab, E.A. Gebreyohannes, A.S. Bhagavathula, A.A. Elnour, Nonadherence to antihypertensive drugs: A systematic review and meta-analysis, *Medicine* (Baltimore), **96**(4), e5641 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005641>
4. I. Krass, P. Schieback, T. Dhippayom, Adherence to diabetes medication: A systematic review, *Diabet. Med.*, **32**(6), 725-737 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1111/dme.12651>

5. J. Jin, G.E. Sklar, V.M.S. Oh, L.S. Chuen, Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective, *Ther. Clin. Risk Manag.*, **4**(1), 269-286 (2008). Doi: <https://doi.org/10.2147/tcrm.s1458>
6. B. Presley, W. Groot, M. Pavlova, Pharmacy-led interventions to improve medication adherence among adults with diabetes: A systematic review and meta-analysis, *Res. Social Adm. Pharm.*, **15**(9), 1057-1067 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2018.09.021>
7. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica Universidad de Granada, Seguimiento farmacoterapéutico: Método Dáder (3a revisión: 2005). *Pharmacy Practice*, 2006 **4**(1), 44-53 (2006). URL: <https://scielo.isciii.es/pdf/pharmacy/v4n1/giaf.pdf>
8. H. Escobar-Correa, A. Flores-Ramírez, M.A. Urina-Triana, La importancia de la evaluación de la adherencia farmacoterapéutica en sujetos con enfermedad cardiovascular, *Arch. Venez. Farmacol. Terap.*, **39**(6), 767-774 (2020).
9. A.C.d.S.E. Silva, D.S.d.C. Sousa, E.B.d.C. Perraud, F.R.d.A. Oliveira, B.C.C. Martins, Pharmacotherapeutic follow-up in a respiratory intensive care unit: description and analysis of results, *Einstein* (Sao Paulo), **16**(2), eAO4112 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4112>
10. E.V. Herrera, T.L. Cortés, O.L. Valenzuela, E.A. García, J.F. Velázquez, J.G. López, Aplicación del método DÁDER de Seguimiento farmacoterapéutico para pacientes con hipertrigliceridemia de la zona centro del estado de Veracruz-México, *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **43**(1), 58-63 (2012).
11. D.N. Guzman-Tordecilla, A. Bernal-García, I. Rodríguez, Interventions to increase the pharmacological adherence on arterial hypertension in Latin America: A systematic review, *Int. J. Public Health*, **65**(1), 55-64 (2020). Doi: <http://doi.org/10.1007/s00038-019-01317-x>
12. World Health Organization, *Body mass index - BMI*. URL: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
13. D. Sabater-Hernández, M. Silva-Castro, M.J. Faus-Dader, Método DADER. Seguimiento Farmacoterapéutico, 3a ed., Universidad de Granada, 2007, 127 p. URL: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/33051/GuiaDader2007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

14. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica (CTS-131), Universidad de Granada (España), Grupo de Investigación en Farmacología (CTS-164), Universidad de Granada (España), Fundación Pharmaceutical Care España, Sociedad Española de Farmacia Comunitaria (SEFaC), Tercer Consenso de Granada sobre Problemas Relacionados con Medicamentos (PRM) y Resultados Negativos asociados a la Medicación (RNM), *Ars Pharm.*, **48**(1), 5-17 (2007).
15. C. Gallo-Acosta, J.O. Vilosio, J. Saimovici, Actualización de los criterios STOPP-START: una herramienta para la detección de medicación potencialmente inadecuada en ancianos, *Actualización en la Práctica Ambulatoria*, **18**(4), 124-129 (2016). Doi: <https://doi.org/10.51987/evidencia.v18i4.6366>
16. P. Gallagher, D. O'Mahony, STOPP (Screening Tool of Older Persons' potentially inappropriate Prescriptions): Application to acutely ill elderly patients and comparison with Beers' criteria, *Age and Ageing*, **37**(6), 673-679 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1093/ageing/afn197>
17. K.T. Selçuk, C. Çevik, Y. Mercan, H. Koca, Hypertensive patients' adherence to pharmacological and non-pharmacological treatment methods, in Turkey, *Int. J. Commun. Med. Public Health*, **4**(8), 2648 (2017). Doi: <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20173308>
18. A. Cordero, L. Rodríguez-Padial, A. Batalla, L. López-Barreiro, F. Torres-Calvo, J.M. Castellano, *et al.*, Optimal pharmacological treatment and adherence to medication in secondary prevention of cardiovascular events in Spain: Results from the CAPS study, *Cardiovasc. Ther.*, **35**(2), e12240 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12240>
19. W.G. Espeche, R. Sabio, A. Diaz, R. Parodi, C.E.L. Sisnieguez, R.A. Flores, *et al.*, Analysis of adherence to antihypertensive drug treatment in an Argentinean cohort, *Int. J. Cardiovasc. Sci.*, **33**(3), 272-277 (2020). Doi: <https://doi.org/10.36660/ijcs.20190069>
20. N.U.L. Tavares, A.D. Bertoldi, S.S. Mengue, P.S.D. Arrais, V.L. Luiza, M.A. Oliveira, *et al.*, Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil, *Rev. Saude Publica*, 2016;50(suppl 2), 10s (2016). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006150>
21. J.E. Machado-Alba, S. Torres-Rodríguez, A. Vallejos-Narváez, Effectiveness the pharmaceutical care in diabetic patients, *Colomb. Med.*, **42**(1), 72-80 (2011).

22. A. Montalvo, I. Florez-Torres, Características de los cuidadores de personas en situación de cronicidad. Cartagena (Colombia): Un estudio comparativo, *Rev. Salud Uninorte*, **24**(2), 181-190 (2011).
23. S. Baroletti, H. Dell'Orfano, Medication adherence in cardiovascular disease, *Circulation*, **121**(12), 1455-1458 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.904003>
24. H.-Y. Xu, Y.-J. Yu, Q.-H. Zhang, H.-Y. Hu, M. Li, Tailored interventions to improve medication adherence for cardiovascular diseases, *Front. Pharmacol.*, **11**, 510339 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.510339>
25. I.M. Kronish, S. Ye, Adherence to cardiovascular medications: Lessons learned and future directions, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **55**(6), 590-600 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2013.02.001>

### **Anexo 1.** Test de cumplimiento SMAQ (The Medication Adherence Questionnaire)

Consta de 6 preguntas:

1. ¿Alguna vez olvida tomar la medicación? (Sí/No).
2. ¿Toma siempre los fármacos a la hora indicada? (Sí/No).
3. ¿Alguna vez deja de tomar los fármacos si se siente mal? (Sí/No).
4. ¿Olvidó tomar la medicación durante el fin de semana? (Sí/No).
5. En la última semana, ¿cuántas veces no tomó alguna dosis? (A: ninguna/B: 1-2/C: 3-5/10/E: más de 10).
6. Desde la última visita, ¿cuántos días completos no tomó la medicación? (Días: ...).

Se considera incumplidor si el paciente responde en la pregunta 1, sí; en la 2, no; en la 3, sí; en la 4, sí; en la 5, C, D o E, y en la 6, más de 2 días. El cuestionario es dicotómico, por tanto, cualquier respuesta en el sentido de no cumplimiento se considera incumplimiento. La pregunta 5 se puede usar como semicuantitativa, asignándose un porcentaje de cumplimiento según la respuesta: A, 95-100% de cumplimiento; B, 85-94% de cumplimiento; C, 65-84% de cumplimiento; D, 30-64% de cumplimiento, y E, menos del 30% de cumplimiento.

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

D.I. Molina de Salazar, M. Urina-Triana, J. Abuabara-Turbay, T. Espinoza-Espitia, A. Flores-Ramírez, Á. Vallejos-Narváez, G. Castro, Factores relacionados con la adherencia al tratamiento en pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles en tres ciudades colombianas, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 868-887 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110746>

# Biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and *Candida* spp. isolated from oral cavity of students of the State University of Goiás, Brazil

Reuber Mendes Rocha<sup>a</sup>, Plínio Lázaro Faleiro Naves<sup>b</sup>

Postgraduate Program in Sciences Applied to Health Products. Bioassay Laboratory, Central Campus of the State University of Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil.

ORCID: <sup>a</sup><https://orcid.org/0000-0001-8915-0512>, <sup>b</sup><https://orcid.org/0000-0003-1936-1837>

E-mail addresses: a [reuber.mr@gmail.com](mailto:reuber.mr@gmail.com), b [plinionaves@ueg.br](mailto:plinionaves@ueg.br)

Received: August 27, 2022

Corrected: March 30, 2023

Accepted: May 7, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** Tooth brushing is an important measure in promoting oral health. However, the brush suffers the deposition and proliferation of microorganisms in its bristles during its use. In addition, a correlation has been demonstrated between the microbial load found on toothbrushes and the dental status of patients. **Aim:** To evaluate the biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and *Candida* spp. isolated from the oral cavity of students at the State University of Goiás. **Methodology:** The methodology employed in this study allowed the collection, isolation, and presumptive morphological identification of oral microorganisms, and allowed the evaluation of biofilm formation by both microorganisms in sterile toothbrushes. **Results:** All microbial isolates were able to form biofilms under the tested conditions, with microbial cell counts adhered to the biofilm ranging from 6.75 to 11.00 log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup> for mutans group streptococci, and 4.94 to 5.79 log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup> for *Candida* spp. Mutans group streptococci and *Candida* spp. were isolated from 92.31% of brushes used in the collection of samples from the oral cavity of the volunteers. **Conclusion:** All microorganisms isolated were able to form biofilm on toothbrushes, which corroborates the importance of care with decontamination of toothbrushes in promoting oral health.

**Keywords:** Microbial biofilm, mouth, tooth decay, oral candidiasis, students.



## RESUMO

### Formação de biofilme em escovas dentais por estreptococos do grupo mutans e *Candida* spp. isolados da cavidade oral de alunos da Universidade Estadual de Goiás, Brasil

**Introdução:** a escovação dentária é uma medida importante na promoção da saúde bucal. No entanto, a escova sofre a deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante o seu uso. Além disso, foi demonstrada uma correlação entre a carga microbiana encontrada nas escovas de dente e o estado dentário dos pacientes. **Objetivo:** avaliar a formação de biofilme em escovas dentais por estreptococos do grupo mutans e *Candida* spp. isolados da cavidade oral de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. **Metodologia:** a metodologia empregada neste estudo permitiu a coleta, o isolamento e a identificação morfológica presuntiva de micro-organismos bucais, bem como a avaliação da formação de biofilme por ambos os micro-organismos em escovas dentais estéreis. **Resultados:** que todos os isolados microbianos foram capazes de formar biofilmes nas condições testadas, com contagens de células microbianas aderidas ao biofilme variando de 6,75 a 11,00  $\log_{10}$  ufc·mL<sup>-1</sup> para estreptococos do grupo *mutans* e 4,94 a 5,79  $\log_{10}$  ufc·mL<sup>-1</sup> para *Candida* spp. Foram isolados estreptococos do grupo mutans e *Candida* spp. em 92,31% das escovas usadas na coleta de amostras da cavidade bucal dos voluntários. **Conclusão:** todos os micro-organismos isolados foram capazes de formar biofilme nas escovas, o que reforça a importância dos cuidados com a descontaminação das escovas dentais na promoção da saúde bucal.

*Palavras-chave:* Biofilme microbiano, boca, cárie dentária, candidíase bucal, estudantes.

## RESUMEN

### Formación de biopelículas en cepillos de dientes por estreptococos del grupo mutans y *Candida* spp. aislados de cavidad oral de estudiantes de la Universidad Estatal de Goiás, Brasil

**Introducción:** el cepillado de dientes es una medida importante en la promoción de la salud bucal. Sin embargo, el cepillo sufre la deposición y proliferación de microorganismos en sus cerdas durante su uso. Además, se demostró una correlación entre la carga microbiana encontrada en los cepillos de dientes y el estado dental de

los pacientes. **Objetivo:** evaluar la formación de biofilm en cepillos de dientes por estreptococos del grupo mutans y *Candida* spp. aislados de la cavidad oral de estudiantes de la Universidad Estadual de Goiás. **Metodología:** la metodología utilizada en este estudio permitió la recolección, el aislamiento y la identificación morfológica presuntiva de los microorganismos orales, así como la evaluación de la formación de biofilms por los microorganismos en cepillos dentales estériles. **Resultados:** todos los aislados microbianos pudieron formar biofilms en las condiciones probadas, con recuentos de células microbianas adheridas a la biopelícula entre 6,75 - 11,00 log<sub>10</sub> ufc·mL<sup>-1</sup> para los estreptococos del grupo mutans y entre 4,94 - 5,79 log<sub>10</sub> ufc·mL<sup>-1</sup> para las *Candida* spp. Los estreptococos del grupo mutans y *Candida* spp. fueron aislados en el 92,31% de los cepillos utilizados para la toma de muestras de la cavidad bucal de los voluntarios. **Conclusión:** todos los microorganismos aislados fueron capaces de formar biofilms en los cepillos de dientes, lo que refuerza la importancia del cuidado de la descontaminación de los cepillos de dientes en la promoción de la salud bucal.

*Palabras clave:* Biopelícula microbiana, boca, caries dental, candidiasis oral, estudiantes.

## INTRODUCTION

Oral microbiota refers to the term used to determine the group of more than 700 species of microorganisms that symbiotically inhabit the oral cavity and that may be beneficial or harmful to the human host. Current evidence demonstrates that the microbiota plays a crucial role in the associations between oral and general systemic health [1].

Streptococci of the mutans group constitute about 70% of the cultivable microorganisms in the oral cavity. They are Gram-positive, ovoid bacteria, organized in pairs or chains that ferment dietary sugars and have acidogenic and adherence capacity. In addition, they initiate and have a strong role in the production, increase and maturation of biofilms [2].

Previously, *Streptococcus mutans* were thought to be the only cause of dental caries [3]. However, it has recently been shown that *Candida albicans* also plays a critical role in the development of root caries, causing significant microbial dysbiosis and increased abundance of acidogenic/aciduric *S. mutans*, which leads to the formation of a more cariogenic polymicrobial biofilm [4].

The microbial biofilm is the polymicrobial grouping involved in a viscous matrix composed of water, exopolysaccharides, proteins, nucleic acids and substances absorbed by the attached microorganisms that bind to the film acquired on the surface of the tooth [5]. This film is formed within 15 minutes after cleaning and polishing the dental enamel and is considered the first step for the fixation of *S. mutans* and the formation of dental biofilm [6].

Adequate control of the biofilm in the oral cavity results in a lower risk for the development of oral and systemic diseases arising from the oral microbiota [7], and the toothbrush is an important instrument in the promotion of oral health.

Apposite tooth brushing provides partial removal of oral biofilm with reduction of microorganisms related to the etiology of dental caries [8].

However, the brush itself can become an environment for deposition and proliferation of microorganisms in its bristles [9]. In addition, a correlation has been demonstrated between the microbial load found on toothbrushes and the dental status of patients [10].

In this context, the objective of this work was to evaluate, under laboratory conditions, the formation of biofilm on toothbrushes by streptococci of the mutans group and *Candida* spp. isolated from the oral cavity of students at the State University of Goiás in Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Obtaining saliva samples

This study was submitted to the Research Ethics Committee of the State University of Goiás (UEG) in accordance with resolutions 196/96 and 466/12 for research involving human beings of the Ministry of Health and the National Health Council through the Brazil Platform with approval number 3.604.978. Consultation and free, prior and informed consent (FPIC) was signed and a copy delivered to the participant before any procedure in this research.

Saliva samples were collected with stimulation by tooth brushing, from 13 students at the Central Campus of the State University of Goiás in the city of Anápolis. Volunteers were included according to the inclusion criteria: being of legal age, agreeing to participate in the research by signing the necessary documentation, having good systemic health, not having eaten in the period between the last brushing and collection, not having brushed their teeth before collection and not having any missing tooth in the oral cavity, except for third molars.

In the act of collecting the material, information was collected and then the volunteers were instructed on brushing with the modified Bass technique [11]. An illustrated insert was presented in order to facilitate brushing and standardize sample collection by the participants, and the brushing time was timed. Toothpaste or dental floss was not used and the tongue was not brushed.

Saliva samples were collected with new, disposable brushes with a size 30 rounded head, 20 tufts, 840 bristles and 14 cm long soft bristles that were previously sterilized in an autoclave at 125 °C for 15 minutes.

Volunteers were taken to the bathroom and requested that, as soon as brushing was completed, the brushes were immediately returned to be placed in Falcon tubes containing 15 mL of 0.9% sodium chloride sterile saline solution for transport, and subsequent processing in the Microbiology Laboratory.

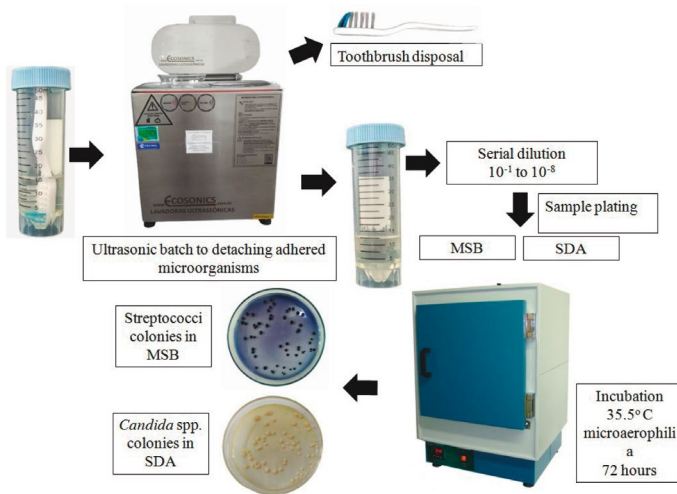
### **Microbiological processing**

The samples were submitted to sonication to detach the microorganisms adhered to the brushes in an ultrasonic bath at 40 kHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) for 5 minutes at room temperature [12]. Then the brushes were discarded and the supernatants were diluted and plated up to 10<sup>-8</sup> for the isolation of the collected microorganisms.

Microbial samples were subcultured onto mitis salivarius agar (MSB) (Himedia, Mumbai, India) supplemented with 20% sucrose PA (Neon, São Paulo, Brazil), 0.2 IU bacitracin (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany) and 1% potassium tellurite (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) for the isolation of mutans group streptococci and on Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDA) (KASVI, São José dos Pinhais, Brazil) for isolation of *Candida* spp. [13]. The plates were incubated at 35.5 °C in microaerophilia for 72 hours (Figure 1).

After incubation, growth readings were performed in the culture media with a colony counter (MA-6000, Marconi, Piracicaba, Brazil) for the presumptive identification of the microorganisms recovered from each brush.

The presumptive identification of the isolated microorganisms was carried out based on the analysis of colonial aspects such as morphology, color, texture and odor after growth in the respective selective culture media. The enriched MSB medium is highly selective for *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* and *S. mitis*. Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch were identified as mutans group streptococci in this study [14, 15].



**Figure 1.** Microbiological processing of samples.

For the isolation and identification of *Candida* spp., the criteria used were growth in SDA with chloramphenicol, with formation of whitish, spherical colonies, with a slightly darker center and odor of the plates similar to bread fermentation [16].

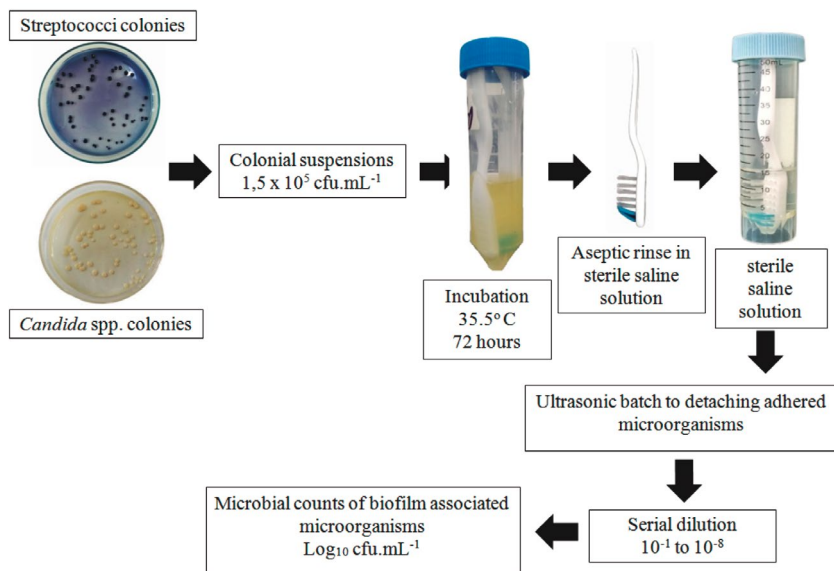
After identification, the isolated microorganisms were frozen in aliquots for further studies of biofilm formation [17].

### Biofilm formation on brushes

Aliquots of the isolated microorganisms were subcultured in the respective culture media and after incubation at  $35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in microaerophilia for 72 hours, and then the purity of the cultures was checked. Subsequently, three to five typical colonies were dissolved in 0.9% sterile saline solution (0.9% SSS) at approximately  $1.5 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup> with the 0.5 McFarland scale. Then, 200  $\mu\text{L}$  of the suspension was transferred to Falcons tubes with 19,800  $\mu\text{L}$  of Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Himedia, Mumbai, India) adjusting and the initial inoculum for the biofilm formation assay at  $1.5 \times 10^5$  cfu·mL<sup>-1</sup>.

After preparation of the microbial inocula, sterile toothbrushes were aseptically placed in Falcon tubes and the samples were incubated. Then, the brushes were removed with sterile forceps and then rinsed in a Falcon tube with 20 mL of 0.9% SSS. After this pro-

cedure, the brushes were transferred to other tubes with 20 mL of 0.9% SSS and sonicated in an ultrasonic bath at 40 kHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) for 5 minutes at room temperature [12] for detachment of attached colonies and subsequent counting in MSB and SDA media, for growth of mutans streptococci and *Candida* spp., respectively (Figure 2).



**Figure 2.** Biofilm formation assay on sterile toothbrushes.

All microorganisms were evaluated in three independent replicates. The results of the counts were transformed into  $\log_{10}$  and the means and standard deviations were calculated. Sterility controls and the *Candida albicans* ATCC 10231 were included in the assay.

## RESULTS

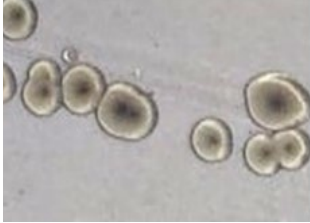

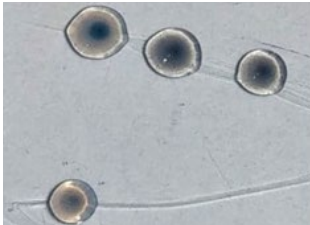
### Isolation and presumptive identification

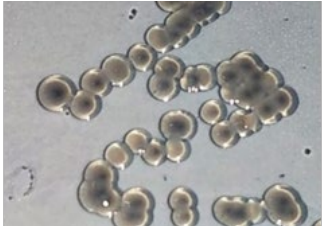
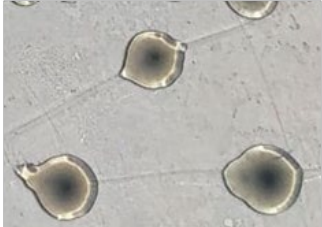
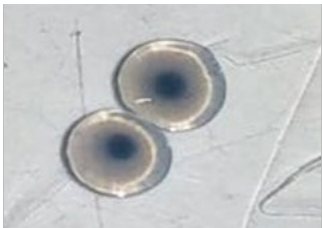

Of the total of 13 brushes processed, microorganisms were isolated in 12 (92.31%), in 1 (7.69%) brush were not isolated. A toothbrush that showed microbial growth was removed from the study due to the waiving of a volunteer from participating in the investigation.

A total of 15 types of colonies were obtained in the 11 brushes with microbial growth. Of these, 10 colonies were suggestive of mutans group streptococci and 5 colonies of *Candida* spp. In 6 (54.54%) brushes were isolated only streptococci of the mutans group, in 4 (36.36%) brushes were isolated both microorganisms and in 1 (9.10%) brush only *Candida* spp. was found.

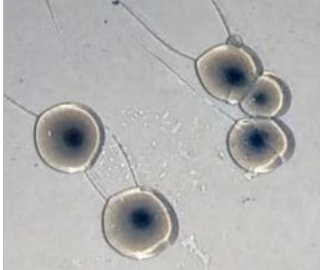


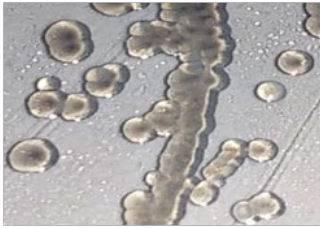

Table 1 presents the morphological description and presumptive identification of the isolated microorganisms.

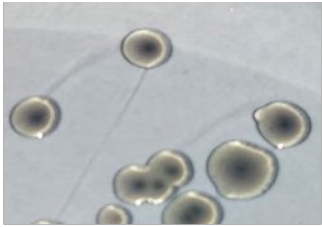
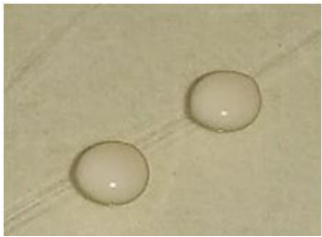

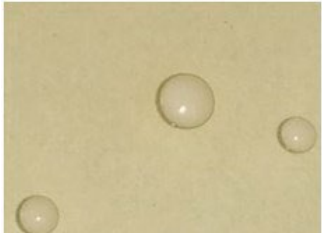
**Table 1.** Presumptive identification based on colonial morphology of the isolated microorganisms.

Brush	Culture medium / Colonial morphology	Image	Identification
2	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread.		<i>Candida</i> spp.
4	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci

Brush	Culture medium / Colonial morphology	Image	Identification
5	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
6	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
7	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> spp.



Brush	Culture medium / Colonial morphology	Image	Identification
8	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> spp.
9	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
10	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
11	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> spp.

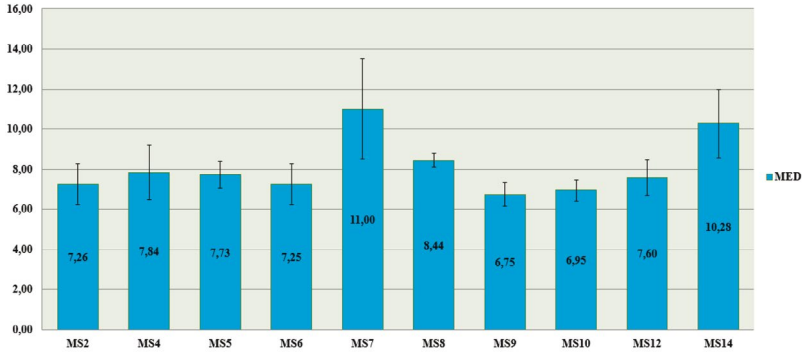
Brush	Culture medium / Colonial morphology	Image	Identification
12	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> spp.
14	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
Ca ATCC 10321	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida albicans</i>

### Biofilm formation on brushes

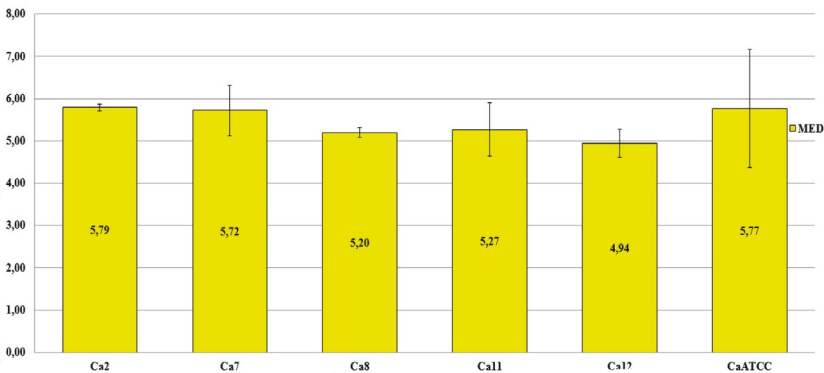
All microbial isolates were able to form biofilms under the tested conditions, with microbial cell counts adhered to the biofilm ranging from 6.75 to 11.00 log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup> for mutans streptococci, and 4.94 to 5.79 log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup> for *Candida* spp.

The isolates MS7 and MS14 were the major biofilm formers, with counts of 11.00 ± 2.51 and 10.28 ± 1.70 log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup>, respectively. The other streptococci remained

with more homogeneous counts. The isolated yeast counts were more uniform, as shown in Figures 3 and 4.



**Figure 3.** Mutans group streptococci cell count ( $\log_{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup>) recovered from the microbial films adhered in toothbrushes. MS: mutans group streptococci; cfu: colony forming unit.



**Figure 4.** *Candida* spp. cell count ( $\log_{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup>) recovered from the microbial films adhered in toothbrushes. Ca: *Candida* spp.; cfu: colony forming unit; ATCC: American Type Culture Collection

## DISCUSSION

The oral cavity is colonized by several types of microorganisms, with the establishment of a transient microbiota, generally controlled by microbial antagonism with the resident microbiota and by routinely employed hygiene [1]. In the present study, brushes were used to isolate mutans group streptococci and *Candida* spp. of the oral cavity of

volunteers. Subsequently, we verified the ability of the isolates to form biofilms on sterile brushes. In the first stage of the study, microorganisms were isolated in 92.31% of the brushes used to obtain the microbial samples. Of the 15 microorganisms isolated, 10 were mutans group streptococci and 5 were *Candida* spp.

Tooth brushing is essential for oral hygiene, however the use of a toothbrush requires care such as proper cleaning and frequent replacement to minimize contamination, because during brushing, part of the oral microbiota can be transferred to the brush and the toothbrush, and from then on, the microbial load tends to increase and diversify with each use [18, 19].

The mutans group streptococci are present in 90% of the world population, while *C. albicans* are isolated in 30-50% [20]. *S. mutans* are related to the installation and progression of dental caries due to their ability to primarily adhere to the smooth surface of the tooth and allow the subsequent aggregation of other acidogenic microorganisms, with increased sucrose metabolism, lactic acid release and maturation of polymicrobial biofilm [21].

Yeasts of the *Candida* genus are part of the oral microbiota in situations of normality of the host, but they can behave as pathogens when local and systemic factors are triggered [22]. In addition, *C. albicans* has the ability to colonize the oral mucosa and denture surfaces, and is reported as a frequent cause of oropharyngeal infections and has cariogenic potential, being found in 10% of decayed teeth without *S. mutans* [23].

By itself, *C. albicans* has no cariogenic capacity, but in the presence of sucrose, aggregation with *S. mutans* occurs, increasing the amount of aciduric acid-tolerant microorganisms and the production of extracellular matrix. Therefore, there is a relationship between the levels of caries, the amount of microorganisms and their ability to form biofilms. In this way, the mixed biofilm of these microorganisms can intensify the cariogenic processes [24, 25]. Furthermore, *Candida* is an opportunistic fungus, and oral pathological manifestations are directly related to the immune status of the host [26] since the occurrence of microbial biofilm in this anatomical site is related to the oral health of the patient.

The data presented in figures 3 and 4 indicate that all the isolates were able to form biofilms on the brushes, with high counts of microorganisms associated with the biofilms. These results are similar to the results obtained by other authors, although using different substrates and methodologies. In a study [27] on *S. mutans* biofilm formation on bovine tooth enamel, the counts obtained in the control group ranged from 5.00 to 10.00  $\log_{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup>. The results found in the viability controls of studies that evaluated the inhibition of biofilm formation by *S. mutans* were 6.5 and 10.00  $\log_{10}$  cfu·mL<sup>-1</sup>,

respectively [28, 29]. Regarding the cell counts associated with *Candida* biofilm, other authors found counts ranging from 4.02 to 9.50 Log<sub>10</sub> cfu·mL<sup>-1</sup> cells [30-33]. Biofilms constitute a form of existence of microorganisms encapsulated in an extracellular matrix that holds cells together and forms a three-dimensional structure resistant to extrinsic adversities [34]. In the oral cavity, the biofilm is adhered to the surfaces of the mouth in general and tends to establish itself and increase if there is no chemical or mechanical interference [35]. Thus, microbial control methods are used to reduce microbial biofilm and maintain oral health, the use of mouthwashes and tooth brushing are common methods used for this purpose.

## CONCLUSION

In summary, in this work we evaluated the biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and *Candida* spp. isolated from the mouths of students at the State University of Goiás. The sample collection methodology proved to be effective, as microorganisms were not recovered in just one brush collected. In the second part of the study, it was detected that all isolates were able to form biofilms on the brushes, and that the isolates showed considerable counts of microorganisms associated with the biofilm, with emphasis on the counts of streptococci of the mutans group. In agreement with other authors [36, 37], the results obtained in this study highlight the importance of taking care with the decontamination of toothbrushes in the promotion of oral health.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank our laboratory colleagues Kamila Cecílio, Osvaldo Gomes, Pabline Gasparotti, Amanda Correia and Valéria Oliveira for their contributions at various stages of the work, and to the volunteers who kindly participated in the sample collection stage. We also thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## CONFLICT OF INTEREST

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

## REFERENCES

1. C. Barboza-solís, L.A. Acuña-amador, The oral microbiota: A literature review for updating professionals in dentistry. Part I, *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, **22**(3), 59-68 (2020). Doi: <https://doi.org/10.15517/ijds.2020.39178>.
2. A. Schubert, R. Bürgers, F. Baum, O. Kurbad, T. Wassmann, Influence of the manufacturing method on the adhesion of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* to oral splint resins, *Polymers*, **13**(15340), 1534 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym13101534>.
3. N. Philip, B. Suneja, L. Walsh, Beyond *Streptococcus mutans*: Clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome, *British Dental Journal*, **224**, 219-225 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.81>.
4. Q. Du, B. Ren, J. He, X. Peng, Q. Guo, L. Zheng, J. Li, H. Dai, X. Vivian, L. Zhang, Z.X. Xu, *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis, *The ISME Journal*, **15**, 894-908 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00823-8>.
5. T. Gong, X. He, J. Chen, B. Tang, T. Zheng, M. Jing, Y. Lin, Y. Pan, Q. Ma, Y. Li, X. Zhou, Transcriptional profiling reveals the importance of RcrR in the regulation of multiple sugar transportation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*, *mSystems*. **6**(4), e00788-21 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00788-21>.
6. J.B. Faria, M.B. Santiago, C.B. Silva, V.R. Geraldo-Martins, R.D. Nogueira, Development of *Streptococcus mutans* biofilm in the presence of human colostrum and 3'-sialyllactose, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, **35**(4), 630-635 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1730321>.
7. M.B. da Silva, K.S. Andrade, J.K.M. Oliveira, M.F. Farias, K.T. Fragoso, A.M.R. Cardoso, Condição bucal e doenças respiratórias em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. *Archives of Health Investigation*, 2021, **10**(1), 147-152 (2021). Doi: <https://doi.org/10.21270/archi.v10i1.4935>.
8. E. Greenfield, A.L.F. Marangoni, Avaliação comparativa entre escovas dentais manuais e ultrassônicas para remoção do biofilme, *Revista Odonto*, **27**(54), 19-24 (2019). Doi: <https://doi.org/10.15603/2176-1000/odonto.v27n54p19-24>.

9. A. Ansari, H. Torabzadeh, Z.S. Nabavi, P.S. Hassani, Comparing the effect of dry and wet brushing on dental plaque removal in children, *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **37**(1), 292-296 (2019). Doi: [https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD\\_71\\_19](https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_71_19).
10. M. Bargrizan, R. Fekrazad, N. Goudarzi, N. Goudarzi, Effects of antibacterial photodynamic therapy on salivary *mutans* streptococci in 5- to 6-year-olds with severe early childhood caries, *Lasers in Medical Science*, **34**(3), 433-440 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2650-2>.
11. J. Lindhe, N.P. Lang, T. Karring, *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*, 5<sup>st</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.
12. R.A.C. Chaves, D.M.L. Ribeiro, J.E. Zaia, E.G. Alves, M.G.M. Souza, C.H.G. Martins, S.F. Mestriner, Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentárias de pré-escolares, *Revista de Odontologia da UNESP*, **36**(1), 29-33 (2007).
13. A.L.S. Cota, R.G. Alvim, Effect of storage temperature on *Streptococcus mutans* viability, *Revista de Odontologia da UNESP*, **47**(2), 74-78 (2018). Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.08317>.
14. M.E. Saravia, L.A.B. Silva, R.A.B. Silva, N.M. Cudmani, S. Tineo, N.E. Hillen, M.P. Lucisano, A.M. Queiroz, C.-G. Emilson, P. Nelson-Filho, Morphological identification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in SB-20M culture medium has efficiency comparable to proteomic identification by the MALDI-TOF mass spectrometry technique, *Archives of Oral Biology*, **110**, 104595 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104595>.
15. X. Zhou, Y. Li, *Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease*, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2020.
16. S. Sridhar, S. Suprabha, R. Shenoy, E. Suman, A. Rao, Association of *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and oral health practices with activity status of caries lesions among 5-year-old children with early childhood caries, *Oral Health & Preventive Dentistry*, **18**(1), 911-919 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a45411>.

17. J.O. Silva, P.P. Costa, S.H.C. Reche, Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C, *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, **40**(1), 73-74 (2020).
18. R.P. Mantovani, A. Sandri, M. Boaretti, A. Grilli, S. Volpi, P. Melotti, G. Burlacchini, M.M. Lleò, C. Signoretto, Toothbrushes may convey bacteria to the cystic fibrosis lower airways. *Journal of Oral Microbiology*, **11**(1), 1647036 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1647036>.
19. A.P. Watanabe, Toothbrush contamination by *Candida* spp. and efficacy of mouthrinse spray for their disinfection, *Mycopathologia*, **169**, 133-138 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9239-z>.
20. P.S. Dabas, An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis, *Journal of Yeast and Fungal Research*, **4**(6), 63-67 (2013). Doi: <https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0113>.
21. A. Kumar, A. Alam, M. Rani, N.Z. Ehtesham, S.E. Hasnain, Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens, *International Journal of Medical Microbiology*, **307**(8), 481-489 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>.
22. D.W. Williams, R.P.C. Jordan, X.-Q. Wei, C.T. Alves, M.P. Wise, M.J. Wilson, M.A.O. Lewis, Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces, *Journal of Oral Microbiology*, **5**, 22434 (2013). Doi: <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22434>.
23. D.F.A. Pereira, C.J. Seneviratne, C.Y. Koga-Ito, L.P. Samaranayake, Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Diseases*, **24**(4), 518-526 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/odi.12691>.
24. H. Koo, D.R. Andes, D.J. Krysan, *Candida*-streptococcal interactions in biofilm associated oral diseases, *PLoS Pathogens*, **14**(12), e1007342 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007342>.
25. S.A. Sounah, A.A. Madfa, Correlation between dental caries experience and the level of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in saliva and carious teeth in a Yemeni adult population, *BMC Research Notes*, **13**, 112 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04960-3>.



26. A. Sharma, Oral candidiasis: An opportunistic infection: A review, *International Journal of Applied Dental Sciences*, **5**(1), 23-27 (2019).
27. C.M. de Souza, M.T. Garcia, P.P. de Barros, L.L.C. Pedroso, R.A.C. Ward, J.F. Strixino, V.M.M. Melo, J.C. Junqueira, Chitosan enhances the Antimicrobial Photodynamic Inactivation mediated by Photoditazine® against *Streptococcus mutans*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **32**, 102001 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102001>.
28. L.M. Tokubo, P.L. Rosalen, J.C.O. Sardi, I.A. Freires, M. Fujimaki, J.E. Umeda, P.M. Barbosa, G.O. Tecchio, N. Hioka, C.F. de Freitas, R.S.S. Terada, Antimicrobial effect of the photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **23**, 94-98 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>.
29. H. Jafri, G. Benerjee, M.S.A. Khan, H.H. Abulreesh, A.S. Althubiani, Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, *AMB Express*, **10**(1), 185 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01123-2>.
30. F. Khan, D. Oh, P. Chandika, D.-M. Jo, N.I. Barmunarachchi, W.-K. Jung, Y.-M. Kim, Inhibitory activities of phloroglucinol-chitosan nanoparticles on mono- and dual-species biofilms of *Candida albicans* and bacteria, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **211**, 112307 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112307>.
31. F.C.T. Coimbra, M.M. Rocha, V.C. Oliveira, A.P. Macedo, V.O. Pagnano, C.H. Silva-Lovato, H.d.F.O. Paranhos, Antimicrobial activity of effervescent denture tablets on multispecies biofilms, *Gerodontology*, **38**(1), 87-94 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/ger.12500>.
32. F.C. da Silva, P.L.F. Rodrigues, T.S.D. Araújo, M.S. Santos, J.M. de Oliveira, L.P. Rosa, G.P.O. Santos, B.P. de Araújo, V.S. Bagnato, Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **26**, 366-370 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.002>.

33. A.L.R. Palma, L. de Paula-Ramos, N. Domingues, G.N. Back-Brito, L.D. de Oliveira, C.A. Pereira, A.O.C. Jorge, Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their susceptibility to antimicrobial effects of photodynamic inactivation, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **24**, 95-101 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.07.003>.
34. R. Li, X. Yuan, J. Wei, X. Zhang, G. Cheng, Z.A. Wang, Y. Du, Synthesis and evaluation of a chitosan oligosaccharide-streptomycin conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Marine drugs*, **17**(1), 43 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/md17010043>.
35. M.L.F.V. de Menezes, Y.V.G. de MAcado, N.M.P. Ferraz, K.F. MAtos, R.O. Pereira, N.M. Fontes, M.I.H.M. Batista, M.R. Paulino, A importância do controle do biofilme dentário: uma revisão da literatura, *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, **55**(1), e3698 (2020). Doi: <https://doi.org/10.25248/reas.e3698.2020>.
36. E.C.F. Queiros, M.A.N. Passos, Aspectos de contaminação e descontaminação das cerdas de escovas dentais, *Revista Ciências e Odontologia*, **3**(1), 1-5 (2019).
37. A. Unahalekhaka, P. Butpan, R. Wongsan, P. Phunpae, K. Preechasuth, Contamination of antimicrobial-resistant bacteria on toothbrushes used with mechanically ventilated patients: A cross sectional study, *Intensive and Critical Care Nursing*, **68**, 103120 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.iccn.2021.103120>.

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

R.M. Rocha, P.L.F. Naves, Biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and *Candida* spp. isolated from oral cavity of students of the State University of Goiás, Brazil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 889-907 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.104480>

# Drugs solubility prediction in mono-solvents at various temperatures using a minimum number of experimental data points

Soma Khezri<sup>1,2</sup>, Parisa Jafari<sup>3,4</sup>, Abolghasem Jouyban<sup>5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>3</sup>Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>4</sup>Kimia Idea Pardaz Azarbayjan (KIPA) Science Based Company, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>5</sup>Pharmaceutical Analysis Research Center and Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>6</sup>Pharmaceutical Sciences Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\*Author to whom correspondence should be addressed: [ajouyban@hotmail.com](mailto:ajouyban@hotmail.com)

Received: February 10, 2023

Corrected: May 2, 2023

Accepted: May 7, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** Solubility is one of the most basic information in a re-crystallization process and in many cases, there are only a few grams (or even mg or  $\mu\text{g}$ ) of an expensive pharmaceutical or fine chemical to make a large number of crystallization tests.

**Aim:** To develop a computational procedure for prediction of drugs solubility in any mono-solvent and temperature of interest using a minimum number of experimental data points.

**Methods:** For achieving this purpose, here, the available solubility data sets were collected from the recently published articles and selected a minimum data point of each dataset to train a simple model based on the well-known van't Hoff equation combined with Abraham, Hansen and Catalan parameters as variables presenting the drug-solvent interactions in the solutions. After obtaining the model parameters, the next solubility data in each dataset was predicted by extrapolation method and the accuracy of model was estimated using the computation the mean percentage deviation of the back-calculated data. **Results:** The model adequately trained using a minimum data point could be used as a practical strategy for predic-

ting the solubility of drugs in mono-solvents at different temperatures with acceptable prediction error and using minimum experimental efforts.

**Keywords:** Solubility prediction, extrapolation method, mono-solvent systems, van't Hoff equation, Hansen parameters, Catalan parameters.

## RESUMEN

### Predicción de solubilidad de fármacos en mono-solventes a varias temperaturas utilizando un número mínimo de puntos de datos experimentales

**Introducción:** la solubilidad es una de las informaciones más básicas en un proceso de recristalización y, en muchos casos, solo hay unos pocos gramos (o incluso mg o  $\mu\text{g}$ ) de un producto farmacéutico o químico fino costoso para realizar una gran cantidad de pruebas de cristalización. **Objetivo:** desarrollar un procedimiento computacional para la predicción de la solubilidad de los fármacos en cualquier mono-solvente y la temperatura de interés utilizando un número mínimo de puntos de datos experimentales. **Método:** para lograr este propósito, aquí, los conjuntos de datos de solubilidad disponibles se recopilaron de los artículos publicados recientemente y se seleccionaron puntos de datos mínimos de cada conjunto de datos para entrenar un modelo simple basado en la conocida ecuación de van't Hoff combinada con los parámetros de Abraham, Hansen, Catalán, como variables de presentación de las interacciones fármaco-disolvente en las soluciones. Después de obtener los parámetros del modelo, los siguientes datos de solubilidad en cada conjunto de datos se predijeron mediante el método de extrapolación y la precisión del modelo se estimó mediante el cálculo de la desviación porcentual media de los datos retrocalculados. **Resultados:** el modelo entrenado adecuadamente utilizando puntos de datos mínimos podría utilizarse como una estrategia práctica para predecir la solubilidad de fármacos en mono-solventes a diferentes temperaturas con un error de predicción aceptable y utilizando esfuerzos experimentales mínimos.

**Palabras clave:** Predicción de solubilidad, método de extrapolación, sistemas mono-solventes, ecuación de van't Hoff, parámetros de Hansen, parámetros de Catalán.

## RESUMO

### Previsão de solubilidade de drogas em monossolventes em várias temperaturas usando um número mínimo de pontos de dados experimentais

**Introdução:** a solubilidade é uma das informações mais básicas em um processo de recristalização e, em muitos casos, existem apenas alguns gramas (ou mesmo mg ou  $\mu\text{g}$ ) de um produto farmacêutico ou químico fino caro para fazer um grande número de testes de cristalização. **Objetivo:** desenvolver um procedimento computacional para prever a solubilidade de drogas em quaisquer monossolventes e temperatura de interesse usando um número mínimo de pontos de dados experimentais. **Métodos:** para atingir esse objetivo, aqui, os conjuntos de dados de solubilidade disponíveis foram coletados dos artigos publicados recentemente e selecionados um mínimo de pontos de dados de cada conjunto de dados para treinar um modelo simples baseado na conhecida equação de van't Hoff combinada com os parâmetros de Abraham, Hansen e Catalan como variáveis apresentando as interações fármaco-solvente nas soluções. Depois de obter os parâmetros do modelo, os próximos dados de solubilidade em cada conjunto de dados foram previstos pelo método de extrapolação e a precisão do modelo foi estimada usando o cálculo do desvio percentual médio dos dados calculados de volta. **Resultados:** o modelo adequadamente treinado usando um mínimo de pontos de dados pode ser usado como uma estratégia prática para prever a solubilidade de drogas em monossolventes em diferentes temperaturas com erro de predição aceitável e usando esforços experimentais mínimos.

**Palavras-chave:** Previsão de solubilidade, método de extrapolação, sistemas monossolvente, equação de van't Hoff, Parâmetros de Hansen, Parâmetros catalães.

## INTRODUCTION

In recent times, research upon solubility of a drug/drug-like molecules in the mono-solvents at different temperatures as an important physico-chemical property has become a growing focus in the pharmaceutical fields. The data is required from the early stage of drug synthesis and/or extraction from the natural sources to the large-scale extraction and/or purification stage, wherein the knowledge of solubility is needed to control the desired polymorphic form, supersaturation, yield and particle size [1-5]. Among different mono-solvents, water is a unique solvent in the biologically related processes and aqueous solubility plays a very crucial role in drug discovery and development.

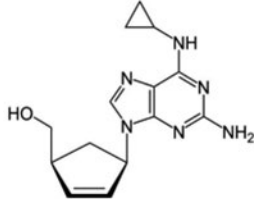
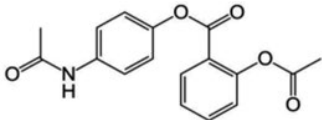
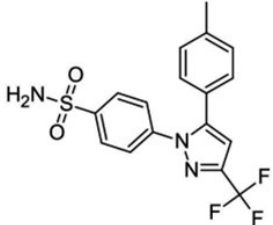
However, 70% [6] or 90% [7] of drug candidates and 40% of the marketed drugs [7] possess low solubility in water and this may cause some problems in their clinical applications and so, the organic solvents are needed for dissolving lipophilic drugs in appropriate dosage forms such as soft gelatin capsules, suppositories, injections and topical preparations. As known, the experimental determination of solubility of a drug/drug-like molecule is still the most reliable method for achieving accurate and valid data and the measurement procedure is a time-consuming process. On the other hand, there are only a few grams/milligrams or even micrograms of an expensive drug/drug-like compound to perform a large number of experiments which is considered as another main limitation of experimental determination. Therefore, any alternative method such as predictive models can be valuable tools for pharmaceutical scientists. Models for the estimation the solubility of drug/drug-like molecules were reviewed by various research groups [8-14].

A high accuracy, simplicity and less required input data of the models are considered as important parameters in their acceptance by the investigators from the viewpoint of pharmaceutical applications. So, the models based on the state equations did not attract more attention in this area. Besides, the purely predictive activity coefficient models such as UNIFAC are needed the bulk properties of the solution to estimate the activity coefficient; hence, they have certain shortcomings because of the complexity of the solute molecules or severe nonideality of the solution [15]. In these cases, semi-empirical or semi-predictive thermodynamic models with a few adjustable parameters can be utilized. The adjustable parameters are trained by a few experimental determinations followed then by extrapolating of their predictive capability over a wide range of operating conditions. Recently, our research group suggested a simple model based on the well-known van't Hoff equation which combined with Abraham, Hansen and Catalan parameters as variables representing the drug-solvent interactions in the solutions to correlate the solubility of drugs in various mono-solvents at working temperatures [16]. The suggested model correlated the solubility of each drug in various mono-solvents at various temperatures with an acceptable accuracy. To continue our systematic investigations for providing computational procedures to predict the solubility of drugs in mono-solvents, the main goal of present study is to collect a minimum number of experimental data points for a drug dissolved in a given mono-solvents at various temperatures for describing a computational procedure to predict the solubility of the drugs in any temperature of interest.

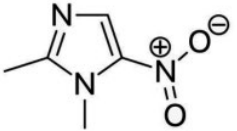
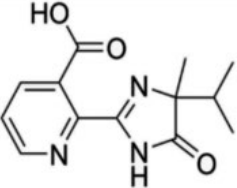
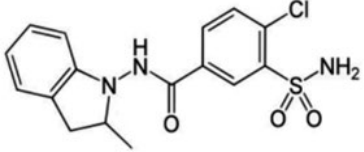
## EXPERIMENTAL DATA AND COMPUTATIONAL SECTION

Details of the collected solubility data of drugs in the mono-solvents at various temperatures from the literature [17-61] are listed in Table 1.

**Table 1.** A brief summary of the drugs characterization in mono-solvents taken from the literature [17-61], the number of data points in each data set (N) and references.

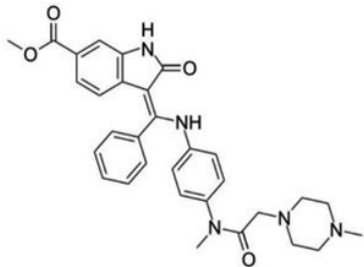
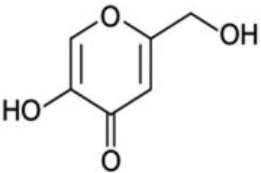
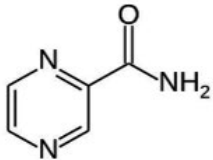
Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Abacavir	286.332	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O		0.39	120	[17]
Benorilate	313.309	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>		2.48	107	[37]
Celecoxib	381.372	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S		4.01	116	[49]

*(Continued)*

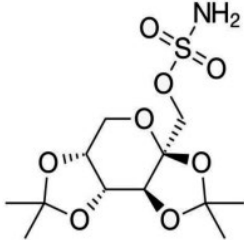
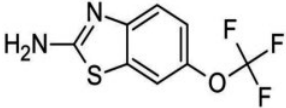
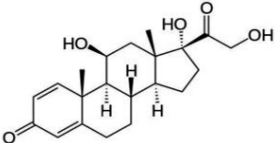
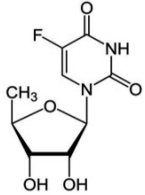
Solute	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Dimetridazole	141.130	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		0.31	107	[50]
Imazapyr	261.280	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		0.22	107	[47]
Indapamide	365.835	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		2.64	89	[55]

(Continued)

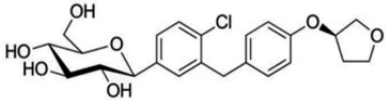
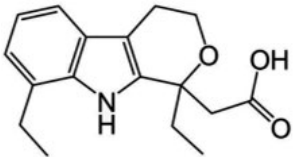
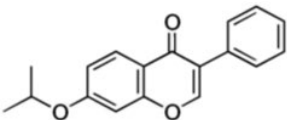
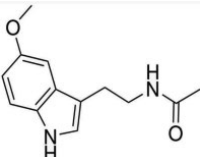
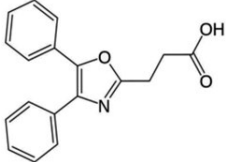


Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Nintedanib	539.625	C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	 <p>The structure of Nintedanib is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One of the benzimidazole nitrogens is substituted with a methyl group. The 2-position of the benzimidazole ring is substituted with a phenyl ring. The 5-position is substituted with a methoxycarbonyl group (-COOCH<sub>3</sub>). The 4-position is substituted with a methylene group (-CH<sub>2</sub>-), which is further substituted with a nitrogen atom. This nitrogen atom is part of a side chain that includes a piperazine ring and a methyl group.</p>	2.79	94	[39]
Kojic acid	142.109	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	 <p>The structure of Kojic acid is a six-membered lactone ring. It has a hydroxyl group (-OH) at the 2-position, a carbonyl group (=O) at the 3-position, and a hydroxymethyl group (-CH<sub>2</sub>OH) at the 5-position.</p>	-0.50	134	[38]
Pyrazinamide	123.113	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	 <p>The structure of Pyrazinamide is a six-membered pyrazine ring. It has a carbonyl group (=O) at the 2-position, which is further substituted with an amino group (-NH<sub>2</sub>).</p>	-1.20	107	[28]

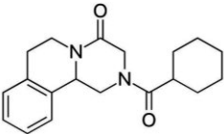
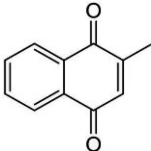
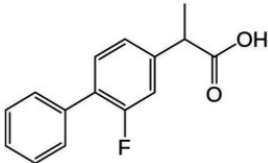
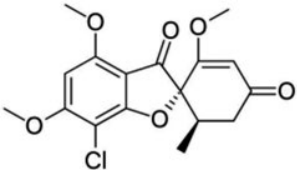
*(Continued)*

Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Topiramate	339.362	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> S		0.13	139	[53]
Riluzole	234.198	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS		3.40	119	[30]
Prednisolone form II	360.444	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>		1.27	98	[52]
Doxifluridine	246.192	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		-1.20	129	[34]

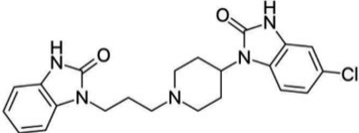
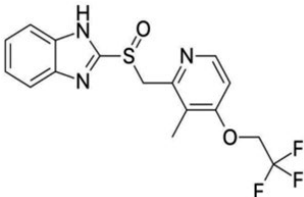
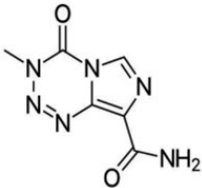
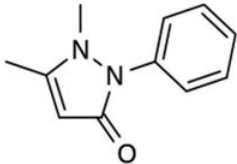
(Continued)

Solute	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Empagliflozin	450.910	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> ClO <sub>7</sub>		1.66	80	[61]
Etodolac	287.353	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>		3.44	115	[45]
Ipriflavone	280.318	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		3.95	116	[36]
Melatonin	232.278	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		1.15	119	[46]
Oxaprozin	293.317	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>		3.46	126	[35]

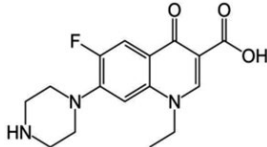
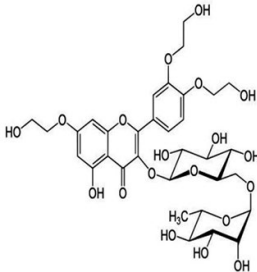
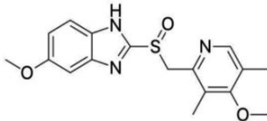
(Continued)

Solute	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Praziquantel	312.406	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		2.30	109	[33]
Vitamin K3	172.180	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		1.89	78	[43]
Flurbiprofen	244.261	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> FO <sub>2</sub>		3.94	107	[56]
Griseofulvin	352.766	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>6</sub>		2.17	107	[25]

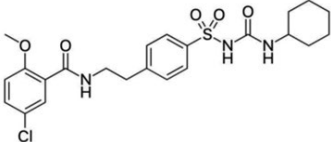
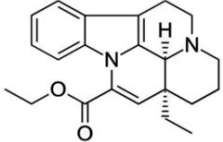
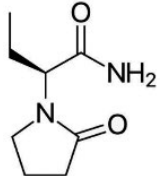
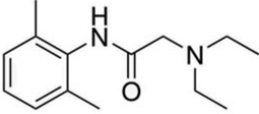
(Continued)

Solute	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Domperidone	425.911	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>		2.90	107	[60]
Lansoprazole	369.361	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S		3.03	107	[42]
Temozolomide	194.151	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		-0.28	89	[32]
Antipyrine	188.226	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O		1.22	89	[18]

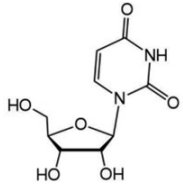
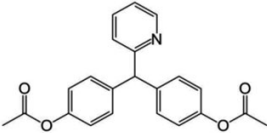
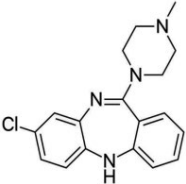
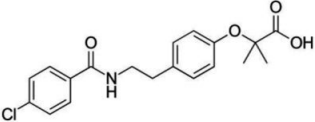
(Continued)

Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Norfloxacin	319.331	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		-0.92	87	[27]
Troloxerutin	742.675	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>		-2.50	87	[31]
Omeprazole	345.416	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		2.43	95	[29]

(Continued)

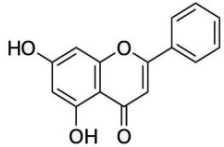
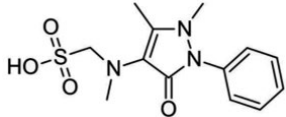
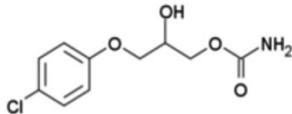
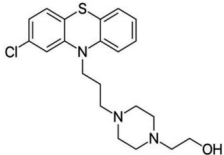
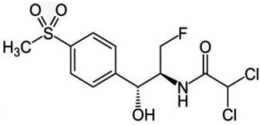
Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Glibenclamide	494.004	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S		3.79	98	[24]
Vinpocetine	350.462	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		4.07	80	[54]
Levetiracetam	170.212	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		-0.59	88	[23]
Lidocaine	234.337	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O		2.84	71	[44]

(Continued)

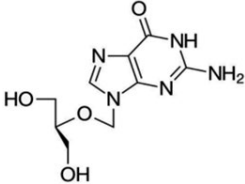
Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Uridine	244.201	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>		-2.40	89	[48]
Bisacodyl	361.391	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>		3.61	29	[21]
Clozapine	326.823	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>4</sub>		3.40	104	[40]
Bezafibrate	361.819	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>4</sub>		3.99	292	[19]

(Continued)



Solute	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Chrysin	254.238	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>		3.01	143	[58]
Dipyrrone	351.360	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S		-0.82	88	[41]
Chlorphenesin	202.635	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>3</sub>		1.10	89	[20]
Perphenazine	403.969	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		3.69	107	[51]
Florfenicol Form A	358.210	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>4</sub> S		0.67	98	[57]

(Continued)

Solute	Molecular weight (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular formula	Structure	Log P	N	Ref
Ganciclovir form I	255.231	C <sub>99</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	 <p>The chemical structure of Ganciclovir form I is a nucleoside analog. It features a central pyrimidine ring system (2,4-diaminopyrimidin-5(1H)-one) attached to a ribose sugar moiety. The ribose sugar is in its furanose form, with hydroxyl groups at the 2' and 3' positions. The pyrimidine ring has an amino group at position 2 and a carbonyl group at position 4. The nitrogen at position 1 of the pyrimidine ring is bonded to the oxygen atom of the ribose sugar's furanose ring.</p>	-2.20	80	[22]

For many pharmaceutical purposes, especially in re-crystallization investigations, it is essential to measure the solubility of drug/drug-like molecules in a given mono-solvent at different temperatures and to express the data as a solubility-temperature curve. Linear solubility-temperature plots are often considered desirable, due to: (i) they can be interpolated and extrapolated accurately; (ii) they can be treated by the common statistics of linear regression; and (iii) they can provide thermodynamic data for the solution process.

The van't Hoff equation (Eq. (1)) [62] is the simplest solubility-temperature function in the pharmaceutical science/industry which provides a good linear plot in most cases. This equation is expressed as:

$$\log S_{m,T} = A + \frac{B}{T} \quad (1)$$

where  $A$  and  $B$  denote the model parameters.

For wider temperature ranges which some deviations from linearity are observed, one may add  $C \log T$  to the model as Eq. (2).

$$\log S_{m,T} = A + \frac{B}{T} + C \log T \quad (2)$$

in which  $C$  is another constant. For obtaining a better picture of the solute (drug/drug-like molecules)–solvent interactions which represents different physico-chemical properties of the solutions involving the solubility of a solute dissolved in a given solvent, it is necessary to introduce suitable parameters into the van't Hoff equation for quantification of these interactions. Hence, various parameters have been considered to quantify these interactions which occurred in the solutions such as Abraham solvation parameters ( $AP_i$ ) [63], Hansen solubility parameters ( $HP_i$ ) [64], and Catalan parameters ( $CP_i$ ) [65].  $AP_i$  can be calculated through the experimental solubility data of different solutes and display a quantitative picture of solute-solvent interactions in the solution where in,  $HP_i$  calculated by the help of a group contribution method [64] and have found applications in the polymer science and other fields. Catalan suggested a set of solvatochromic parameters for a generalized treatment of the solvent's effects [8] which includes solvent polarity/polarizability scale ( $SPP$ ), solvent basicity scale ( $SB$ ), and solvent acidity scale ( $SA$ ), with  $SPP$  parameter recently split into two separate solvent di-polarity ( $SdP$ ) and solvent polarizability ( $SP$ ) scales [65]. In this respect, our research group [66–68] presented that the  $A$  and  $B$  terms of the van't Hoff equation for different drugs in a given solvent system could be correlated using Abraham solute parameters as:

$$\log S_{m,T} = (\alpha_0 + \alpha_1 E + \alpha_2 S + \alpha_3 A + \alpha_4 B + \alpha_5 V) + \left( \frac{\beta_0 + \beta_1 E + \beta_2 S + \beta_3 A + \beta_4 B + \beta_5 V}{T} \right) \quad (3)$$

In another work, a novel multiple linear regression model according to the van't Hoff equation and using a combination of  $AP_i$ ,  $HP_i$  and  $CP_i$  instead of only  $AP_i$ , suggested for an accurate correlation the solubility of a given drug in different mono-solvents at several temperatures as Eq. (4) [16].

$$\log S_T = \left[ \alpha_0 + \sum_{i=1}^5 \alpha_{i,AP} AP_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{i,HP} HP_i + \sum_{i=1}^4 \alpha_{i,CP} CP_i \right] + \left[ \frac{\beta_0 + \sum_{i=1}^5 \beta_{i,AP} AP_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{i,HP} HP_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{i,CP} CP_i}{T} \right] \quad (4)$$

in Eq. (4),  $\alpha_i$  and  $\beta_i$  terms correspond to the model parameters determined by a regression analysis. The obtained results were promising and the suggested model could be recommended for practical applications in the chemical/pharmaceutical industries after some further studies. Based on the good accuracy of this simple model in correlation of drugs solubility data in mono-solvents at different temperatures, this model is used in present work to predict the solubility of drug/drug-like molecules in various mono-solvents at working temperatures. For prediction studies, a minimum number of experimental data points were selected as the training set from each data set taken places from the literature [17-61] and utilized to train the model. The rest of data points (prediction set) were predicted with the trained model by extrapolation method. Details of the collected solubility data are listed in Table 1 of supplementary information along with listing the numerical values of  $AP_i$ ,  $HP_i$  and  $CP_i$  for the investigated solvents in Table 2. Since, the average percentage deviations ( $APD$ ) value is a comparable value with relative standard deviation value for repeated experiments and its numerical value is not affected by the solubility unit expression; the  $APD$  was employed to check the accuracy of predictions and it computed by Eq. (5):

$$APD = \frac{100}{N} \sum \left( \frac{|S_{m,t}^{calculated} - S_{m,t}^{experimental}|}{S_{m,t}^{experimental}} \right) \quad (5)$$

here in  $N$  relates to the number of data points in each data set.

Eventually, the results of the suggested model were validated through a cross validation analysis using "leave one solvent out" method. In each step, one solvent's dataset has been excluded from the training process, model constants were calculated, and been

**Table 2.** List of the investigated solvents, their Catalan parameters [65], the Hansen solubility parameters [69] and the Abraham solvent parameters [Hoy software].

Solvent	Catalan parameters				Hansen solubility parameters			Abraham solvent parameters					
	SA	SB	SP	SdP	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	c	e	s	a	b	v
1,2-Dichloroethane	0.74	0.03	0.77	0.13	14.65	11.26	8.80	0.183	0.294	-0.134	-2.801	-4.291	4.180
1,4-Dioxane	0.31	0.00	0.74	0.44	19.00	1.80	7.40	0.100	0.350	-0.080	-0.560	-4.830	4.170
2-Methyl-propan-1-ol	0.68	0.31	0.66	0.83	13.38	9.53	14.08	0.130	0.250	-0.980	0.160	-3.880	4.110
(±)-2-Ethyl-1-Hexanol	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	14.06	7.45	11.01	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>
Acetic acid	0.68	0.69	0.65	0.39	11.52	16.39	27.05	0.175	0.174	-0.454	-1.073	-2.789	3.725
Acetonitrile	0.97	0.04	0.65	0.29	11.59	12.95	16.34	0.410	0.080	0.330	-1.570	4.390	3.360
Benzene	0.27	0.00	0.79	0.12	18.40	0.00	2.00	0.140	0.460	-0.590	-3.100	-4.630	4.490
Butan-1-ol	0.66	0.34	0.67	0.81	16.00	5.70	15.80	0.170	0.400	-1.010	0.060	-3.960	4.040
Butan-2-ol	0.71	0.22	0.66	0.89	13.38	9.53	14.08	0.190	0.350	-1.130	0.020	-3.570	3.970
Butan-2-one	0.87	0.00	0.67	0.52	16.00	9.00	5.10	0.250	0.260	-0.080	-0.770	-4.860	4.150
Butyl acetate	0.54	0.00	0.67	0.53	14.49	7.74	6.53	0.250	0.360	-0.500	-0.870	-4.970	4.280
Pentyl acetate	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	14.63	7.31	6.25	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>
Chloroform	0.61	0.05	0.78	0.07	17.80	3.10	5.70	0.190	0.110	-0.400	-3.110	-3.510	4.400
Cyclohexane	0.00	0.00	0.68	0.07	16.80	0.00	0.20	0.160	0.780	-1.680	-3.740	-4.930	4.580
Cyclohexanone	0.75	0.00	0.77	0.48	17.80	6.30	5.10	0.040	0.230	0.060	-0.980	-4.840	4.320
Dichloromethane	0.77	0.04	0.76	0.18	18.20	6.30	6.10	0.319	0.102	-0.187	-3.058	-4.090	4.324
DMSO	1.00	0.07	0.83	0.65	18.40	16.40	10.20	-0.190	0.330	0.790	-1.260	-4.540	3.360
Ethane-1,2-diol	0.91	0.72	0.78	0.53	17.00	11.00	26.00	-0.270	0.580	-0.510	0.720	-2.620	2.730

Solvent	Catalan parameters				Hansen solubility parameters			Abraham solvent parameters					
	SA	SB	SP	SdP	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	c	e	s	a	b	v
Ethanol	0.78	0.40	0.64	0.66	15.80	8.80	19.40	0.220	0.470	-1.040	0.330	-3.600	3.860
Ethyl acetate	0.60	0.00	0.66	0.54	15.80	5.30	7.20	0.328	0.369	-0.446	-0.700	-4.904	4.150
Ethyl format	0.71	0.00	0.65	0.48	15.50	8.40	8.40	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>
Formamide	1.01	0.55	0.81	0.41	10.17	17.29	23.38	-0.171	0.070	0.308	0.589	-3.152	2.432
Heptan-1-ol	0.50	0.30	0.71	0.91	14.08	7.80	12.21	0.035	0.398	-1.063	0.002	-4.343	4.317
Heptane	0.00	0.00	0.64	0.08	14.90	0.00	0.00	0.330	0.670	-2.060	-3.320	-4.730	4.540
Hexan-1-ol	0.55	0.32	0.70	0.88	15.90	5.80	12.50	0.120	0.490	-1.160	0.050	-3.980	4.130
Hexane	0.00	0.00	0.62	0.06	15.30	0.00	0.00	0.360	0.580	-1.720	-3.600	-4.760	4.340
iso-Propyl ether	0.32	0.00	0.63	0.66	13.18	7.97	9.03	0.181	0.285	-0.954	-0.956	-5.077	4.542
Methanol	0.90	0.61	0.61	0.55	15.10	12.30	22.30	0.280	0.330	-0.710	0.240	-3.320	3.550
Methyl acetate	0.64	0.00	0.65	0.53	12.68	11.42	11.79	0.351	0.223	-0.150	-1.035	-4.527	3.972
Methyl tert-butyl ether	0.42	0.00	0.62	0.57	13.01	8.56	9.46	0.341	0.307	-0.817	-0.618	-5.097	4.425
<i>N</i> -Methyl pyrrolidone	0.96	0.02	0.81	0.61	18.00	12.30	7.20	0.150	0.530	0.230	0.840	-4.790	3.670
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	0.99	0.03	0.76	0.65	16.80	11.50	10.20	-0.270	0.080	0.210	0.920	-5.000	4.560
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	0.98	0.03	0.76	0.61	17.40	13.70	11.30	-0.310	-0.060	0.340	0.360	-4.870	4.490
Octan-1-ol	0.45	0.30	0.71	0.92	17.00	3.30	11.90	-0.030	0.490	-1.040	-0.020	-4.240	4.220
Octane	0.00	0.00	0.65	0.08	15.50	0.00	0.00	0.223	0.642	-1.647	-3.480	-5.067	4.526
Pentan-1-ol	0.59	0.32	0.69	0.86	13.83	8.82	13.80	0.150	0.540	-1.230	0.140	-3.860	4.080
Propan-1-ol	0.75	0.37	0.66	0.78	16.00	6.80	17.40	0.140	0.410	-1.030	0.250	-3.770	3.990
Propan-2-ol	0.81	0.28	0.63	0.83	12.97	10.35	15.68	0.100	0.340	-1.050	0.410	-3.830	4.030

Solvent	Catalan parameters				Hansen solubility parameters			Abraham solvent parameters					
	SA	SB	SP	SdP	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	c	e	s	a	b	v
Propan-2-one	0.91	0.00	0.65	0.48	15.50	10.40	7.00	0.313	0.312	-0.121	-0.608	-4.753	3.942
Propane-1,2-diol	0.89	0.48	0.73	0.60	12.43	14.25	26.82	-0.150	0.750	-0.970	0.680	-3.130	3.250
Propanoic acid	0.43	0.61	0.66	0.38	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Propyl acetate	0.56	0.00	0.67	0.55	13.73	9.81	9.56	0.362	0.280	-0.390	-0.975	-4.928	4.183
Iso-propyl acetate	NA	NA	NA	NA	13.55	9.88	8.50	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Iso-butyl acetate	NA	NA	NA	NA	13.87	9.26	7.93	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tetrahydrofuran	0.63	0.00	0.71	0.59	16.80	5.70	8.00	0.210	0.370	-0.390	-0.240	-4.930	4.450
Toluene	0.28	0.00	0.78	0.13	18.00	1.40	2.00	0.140	0.530	-0.720	-3.010	-4.820	4.550
2-Methoxyethanol	NA	NA	NA	NA	12.93	11.44	17.76	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2-Ethoxyethanol	NA	NA	NA	NA	13.26	10.55	16.02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2-Proyethanol	NA	NA	NA	NA	13.49	9.83	14.77	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2-Butoxyethanol	NA	NA	NA	NA	13.65	9.24	13.83	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Methyl Isobutyl Ketone	NA	NA	NA	NA	15.3	6.10	4.10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3-Methyl-butan-1-ol	NA	NA	NA	NA	13.65	8.87	12.95	0.070	0.360	-1.270	0.090	-3.770	4.270
Water	1.00	1.06	0.68	0.03	15.50	16.00	42.30	-0.990	0.580	2.550	3.810	4.840	-0.870

<sup>a</sup>NA: Not available."

utilized to predict the drug solubility in the excluded solvent. All mentioned analyses were performed by employing SPSS 16.0 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The prediction capability of Eq. (4) was investigated by dividing each data set into two subsets, i.e., training data set and prediction data set. In each data set, one point of each mono-solvents with different temperatures was coded as the training data. For example, the solubility of abacavir has been reported in mono-solvents of methanol, ethanol, 1- or 2-propanol, 1- or 2-butanol, 2-methyl-propan-1-ol, 1-pentanol, methyl acetate, ethyl acetate, water and 2-propanone at  $T = (278.15, 283.15, 288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, 313.15, 318.15 \text{ and } 323.15) \text{ K}$  [17]. In this drug, training data were those reported for methanol at 278.15 K, ethanol at 283.15 K, 1-propanol at 288.15 K, 2-propanol at 293.15 K, 1-butanol at 298.15 K, 2-butanol at 303.15 K, 2-methyl-propan-1-ol at 308.15 K, 1-pentanol at 313.18 K, methyl acetate 318.15 K, ethyl acetate at 323.15 K, water at 278.15 K and 2-propanone at 283.15 K. The rest of data points in each data set were coded as the prediction data set. After that, the coded data points as training data set (degree of freedom = 0) were utilized to compute the model constants and the trained models were used to predict the solubility data of prediction data sets. The model constants of Eq. (4) computed by training data points along with reporting the obtained *APD* values for prediction data sets are given in Table 3. As shown in this Table, most of the parameters were not statistically significant and excluded from the regression model when the data were fitted to Eq. (4) using training data points. The non-significant contribution of the parameters to the model may be ascribed as their inter-correlations and also the low number of experimental solubility data points. The most significant independent variables may provide the most accurate correlative model. The calculated overall *APD*  $\pm$  SD for all datasets in Table 3 is  $71.6\% \pm 105.7$  which reached to  $46.6\% \pm 54.8$  by excluding eight data sets with the relatively high *APDs* marked with bold font in Table 3 ( $\geq 100\%$ ).  $46.6\%$  prediction errors can be considered as acceptable errors and the predicted solubility data with this prediction level can provide valuable results for a process designer in the pharmaceutical industry.

Moreover, we utilized “leave one solvent out” method to cross-validate our results of the investigated model. More details of cross-validation of the proposed method are provided in Table 4. As presented in Table 4, the results of overall *APDs*  $\pm$ SD present an increment in above-mentioned model. Based on the *APD* given in this Table, it is clear that the trained models in most cases have a good reliability for drug solubility prediction in the investigated mono-solvents. The overall *APD* for all investi-



gated drug/solvent data sets ( $N=434$ ) is 17424% which is relatively large *APD* for cross-validated data. Chrysin in water produced the largest *APD* (3436865.0%) for cross-validation, followed by ganciclovir form I in toluene (884317.1%), chrysin in hexan-1-ol (785025.8%), ganciclovir form I in propan-2-one (780801.7%) and ethyl acetate (635898.4%), domperidone in acetonitrile (361993.4%) and empagliflozin in ethyl acetate (194200.3%). After excluding these seven very large *APDs*, the overall *APD* is reduced to 1131.3% ( $N=427$ ). When 8 outlier sets of drugs in correlative study producing  $> 100\%$  *APD* (in Table 1) for correlations are excluded from calculation of the overall *APD*, value of 9149% is obtained ( $N=361$ ). These results reveal that further investigations on modeling the solubility data of drugs in mono-solvents at various temperatures are required to provide more accurate correlative/predictive models. Beside these observations, the proposed model is the most comprehensive model to correlate the solubility of a given drug dissolved in various mono-solvents at different temperatures.

## CONCLUSION

In this study, we gathered available solubility data sets from papers published from 2016 to 2022 (43 data sets, 4654 data points totally) and analyzed them using minimum number of data points; as a matter of practical fact, the van't Hoff model combined with solvent parameters of Abraham, Hansen and Catalan is sufficiently accurate predicting solubility in mono-solvents and could be utilized as a practical strategy for predicting the solubility of drugs in mono-solvents at different temperatures with an acceptable prediction error and using minimum experimental efforts. These sorts of predictions are highly in demand in the pharmaceutical industry.

## ACKNOWLEDGEMENT

The research protocol was approved and supported by Student Research Committee (grant # 71580), Tabriz University of Medical Sciences Tabriz, Iran.

## DISCLOSURE OF STATEMENT

The authors report there are no competing interests to declare.

**Table 3.** The model constants and APDs% for the predicted solubility data of drugs in the investigated systems using Eq. (4) trained by selection of one experimental data point at each temperature

drug	$\alpha_0$	$\alpha_{i,AP}$	$\alpha_{i,HP}$	$\alpha_{i,CP}$	$\beta_0$	$\beta_{i,AP}$	$\beta_{i,HP}$	$\beta_{i,BP}$	APD
Abacavir	-19.682	e = -1.257 s = -0.791	$\delta_d = -0.118$	SP = 23.045 SdP = 0.064 SA = 2.893	-	c = 700.618 b = 35.136	$\delta_h = 0.157$	SP = -442.999 SB = 520.990	46.5
Benorilate	11.273	e = 2.232 p = 0.229	-	SP = -13.423 SdP = -4.653	-	v = -1817.650	$\delta_d = 74301$ $\delta_h = 83.405$	SP = 6525.125 SB = 662.603	26.1
Celecoxib	35.410	c = 10.412	$\delta_d = -0.425$	SP = -22.095	-4580.591	e = 286.408	$\delta_p = -123.828$ $\delta_h = -52.882$	SA = 1116.553 SB = -469.441	71.5
Dimetridazole	8.392	c = 3.569 e = -1.628	-	SA = 2.233	-5921.801	b = -339.611 v = -431.611	$\delta_d = -33.194$	SP = 4693.172 SB = -304.933	10.3
Imazapyr	7.381	e = 0.542 a = -0.476	$\delta_p = 0.027$	SP = 1.767 SA = 1.768	-3147.548	b = -13.969 v = -294.228	-	SdP = 194.939 SB = -181.083	16.3
Indapamide	5.488	c = 1.897 b = 0.226	-	SP = -5.507	-8592.495	s = 318.581	$\delta_d = 293.999$ $\delta_p = 150.828$	SA = -1134.282 SB = 2226.803	64.2
Nintedanib	1.136	a = 1.907	$\delta_d = -0.370$ $\delta_p = -0.627$	SdP = 3.494 SA = 4.814	-1195.012	e = -2964.613 v = 943.640	-	SB = -3313.272	61.0
Kojic acid	-24.315	e = -3.826 a = 0.141	-	SP = 41.935	-1387.726	s = -774.090	$\delta_d = -44.979$	SdP = 1115.142 SA = 626.510 SB = -2466.816	29.0
Pyrazinamide	9.099	s = -0.157	$\delta_d = -0.041$	SP = 5.401 SdP = 2.809 SA = -1.578	-5953.921	e = 749.455	-	SB = -320.166	47.5

drug	$\alpha_0$	$\alpha_{i,AP}$	$\alpha_{i,HP}$	$\alpha_{i,CP}$	$\beta_0$	$\beta_{i,AP}$	$\beta_{i,HP}$	$\beta_{i,BP}$	APD
Topiramate	10.769	e = -0.264	-	SP = -4.355	-	c = -369.588 a = -149.214	$\delta_d = -98.316$ $\delta_p = -71.218$	SdP = 742.272 SB = -2382.668	26.2
Riluzole	16.963	-	-	-	-1310.338	-	$\delta_d = -23.999$ $\delta_p = 0.378$	SP = -6228.735 SdP = 203.252 SB = 481.726	<b>137.0</b>
Prednisolone form II	-24.804	e = -5.366 a = 3.718 v = -0.587	$\delta_d = -0.206$	SP = 52.770	-2716.537	c = 2439.545	-	SdP = 655.307 SB = -907.527	9.3
Doxifluridine	-18.304	c = 0.379 e = -1.797 v = 2.590	$\delta_d = -0.061$ $\delta_h = 0.214$	SP = 32.535 SdP = 1.733	-	b = -30.521 v = -1437.516	-	SB = -1773.076	<b>112.4</b>
Empagliflozin	-20.792	b = 0.039	$\delta_d = 0.760$	SA = 8.391	606.824	e = -4364.285	-	SP = 1280.793 SdP = -1105.205 SB = -867.520	71.6
Etodolac	-0.285	e = -7.073	$\delta_d = 0.324$	SdP = 3.507	-8847.899	c = -1100.808 b = -1264.544	$\delta_h = 85.132$	SB = 677.165	14.9
Ipriflavone	-9.548	b = 0.155 v = 6.144	$\delta_d = -0.086$ $\delta_h = -0.04$	SA = 1.952	-5722.758	c = 1554.534 e = -686.757	$\delta_p = 24.361$	SdP = 485.161 SB = -329.238	28.4
Melatonin	12.177	c = 0.631 e = 0.334 v = -0.306	$\delta_d = -0.016$ $\delta_h = 0.103$	SdP = -0.319	-4909.873	a = 94.009	-	SB = -24.638	10.1
Oxaprozin	14.148	v = -3.841	$\delta_d = -0.007$ $\delta_h = 0.001$	SP = 21.527 SdP = -3.245	-3229.086	e = -1426.305 a = 683.816	-	SA = -1243.951 SB = -648.864	40.8
Praziquantel	-20.593	a = 1.164 v = 2.315	$\delta_d = 0.999$	SP = -5.010	-	-	-	SdP = -1655.537 SB = -627.441	37.1

drug	$\alpha_0$	$\alpha_{i,AP}$	$\alpha_{i,HP}$	$\alpha_{i,CP}$	$\beta_0$	$\beta_{i,AP}$	$\beta_{i,HP}$	$\beta_{i,BP}$	APD
Vitamin K3	-12.993	e = -1.439	$\delta_d = 0.004$ $\delta_h = 0.086$	SP= 11.057 SdP = 1.721	-	c = 142.971 b = -38.620	-	SA = -1663.346 SB = 196.505	69.3
Flurbiprofen	-21.017	c = 10.344 e = 4.743 s = 2.856 v = 2.449	-	SP = 4.230	-	-	$\delta_d = -35.009$ $\delta_p = 31.697$	SB = 2327.147	91.5
Griseofulvin	-22.091	c = -0.940	$\delta_d = 0.171$	SP = -4.099	-	e = -2034.664 b = -109.350	-	SP = 9983.085 SA = -1083.258 SB = -2008.944	<b>203.5</b>
Domperidone	-10.821	c = 9.8634 e = -1.368 a = 2.373	$\delta_d = 0.427$	SdP = -0.448	-9434.558	s = 686.935	$\delta_p = 81.664$	SP = 7288.807 SA = -118.561 SB = 3301.489	60.2
Lansoprazole	-47.240	e = 0.169 b = -0.595	$\delta_h = 0.145$	SP = 54.079 SdP = 9.912 SA = 1.604	-	c = 3444.692	$\delta_d = -150.051$ $\delta_p = -24.07$	SB = 508.685	49.2
Temozolomide	1.193	a = 1.098 b = -0.038	$\delta_d = 0.529$ $\delta_p = 0.064$	SdP = -0.670	-	e = -2031.915 v = -1061.107	-	SA = -832.888 SB = -422.814	38.7
Antipyrine	2.499	e = -2.178 a = 0.388	$\delta_d = 0.441$ $\delta_p = 0.208$	SP = -4.930 SdP = -3.461 SA = -0.212	-2193.084	-	-	SB = 553.639	31.6
Norfloxacin	-8.928	v = 0.361	$\delta_h = -0.189$	-	-	e = -1856.797	$\delta_d = 95.705$ $\delta_p = 10.118$	SA = 2318.342 SB = -754.933	<b>102.3</b>
Troloxerutin	7.652	e = 1.159 b = -0.484 v = -3.939	-	-	-2325.136	-	$\delta_d = 81.110$ $\delta_p = 90.663$ $\delta_h = 97.579$	SdP = -2050.713 SA = -2161.060 SB = 209.287	75.6

drug	$\alpha_0$	$\alpha_{i,AP}$	$\alpha_{i,HP}$	$\alpha_{i,CP}$	$\beta_0$	$\beta_{i,AP}$	$\beta_{i,HP}$	$\beta_{i,BP}$	APD
Omeprazole	-67.548	$e = -11.989$	$\delta_d = 1.043$	SP = 49.693 SdP = 1.865	6282.885	$s = -1050.104$	-	SB = -3600.018	238.9
Glibenclamide	-10.418	-	$\delta_h = -0.039$	SP = 45.884	-	$c = -3181.009$ $e = -71.593$	$\delta_d = 186.324$ $\delta_p = 151.188$	SP = -12804.222 SdP = -2485.137 SB = -1798.231	76.2
Vinpocetine	-13.064	$s = 1.560$	$\delta_p = -0.120$	SP = 35.303	-	$c = 301.6$ $v = 175.502$	$\delta_d = -17.186$	SP = -7066.415 SB = -64.579	6.6
Levetiracetam	29.726	$b = 0.143$	$\delta_d = 0.262$	-	-10490.284	$c = -1117.399$ $s =$ $-416.755*st+$ $a = 660.627$	-	SdP = 1368.999 SA = 859.871 SB = -2763.378	<b>309.5</b>
Lidocaine	-13.507	$v = -0.178$	$\delta_d = -0.110$	SP = 12.386 SdP = 0.305	-	$b = -303.230$ $v = 195.796$	-	SB = 266.002	55.4
Uridine	5.739	-	$\delta_d = -0.113$	SdP = 1.990	-4509.827	$e = -1703.893$	-	SP = 4335.731 SA = -86.787 SB = -1619.55	24.4
Bisacodyl	4.598	$c = 0.981$ $e = -4.780$	$\delta_p = -0.142$	SdP = 2.140	-1954.709	$b = -68.684$ $v = -650.054$	$\delta_d = 34.730$	SP = 1545.059 SA = -1345.805 SB = -493.487	7.7
Clozapine	-30.677	$c = 3.826$ $s = 17.4$ $v = 4.14$	$\delta_d = -0.721$	SdP = 1.689 SB = 61.178	-	$s = -4602.226$	$\delta_d = 252.315$	SP = 2384.508 SA = 1056.813 SB = -17741.240	99.3
Bezafibrate	7.998	$c = 6.640$ $e = 0.073$ $b = -0.947$	$\delta_d = -0.630$ $\delta_h = 0.298$	SdP = 9.646 SA = -0.766	-12702.156	$a = 79.841$	$\delta_p = -92.178$	SP = 11740.893 SB = -485.044	57.5



**Table 4.** Leave-solvent-out cross validation for the used model.

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
Abacavir	Methanol	62.1 $\pm$ 7.6	Dimetridazole	Methanol	81.2 $\pm$ 1.4
	Ethanol	66.7 $\pm$ 10.5		Ethanol	77.0 $\pm$ 0.7
	Propan-1-ol	74.6 $\pm$ 8.0		Propan-1-ol	74.5 $\pm$ 1.1
	Propan-2-ol	55.4 $\pm$ 15.6		Propan-2-ol	66.3 $\pm$ 5.4
	Butan-1-ol	72.2 $\pm$ 8.0		Butan-2-ol	74.6 $\pm$ 1.7
	Butan-2-ol	76.8 $\pm$ 8.1		Pentan-1-ol	81.2 $\pm$ 1.4
	2-Methyl-propan-1-ol	65.4 $\pm$ 13.3		Propan-2-one	86.3 $\pm$ 0.2
	Pentan-1-ol	80.4 $\pm$ 7.1		2-Butanone	83.1 $\pm$ 0.5
	Methyl acetate	648.2 $\pm$ 102.4		Cyclohexanone	82.0 $\pm$ 1.4
	Ethyl acetate	367.1 $\pm$ 83.6		Ethyl acetate	86.6 $\pm$ 0.3
	Water	40.4 $\pm$ 7.8		Propyl acetate	- <sup>a</sup>
	Propan-2-one	349.4 $\pm$ 100.9		Isopropyl acetate	-
Benorilate	Methanol	272.3 $\pm$ 20.0	Imazapyr	Methanol	80.0 $\pm$ 1.7
	Ethanol	282.5 $\pm$ 21.9		Ethanol	67.7 $\pm$ 4.8
	Propan-1-ol	324.6 $\pm$ 86.5		Propan-1-ol	62.5 $\pm$ 3.4
	Propan-2-ol	489.2 $\pm$ 64.5		Propan-2-ol	53.9 $\pm$ 5.8
	Butan-1-ol	294.6 $\pm$ 26.2		Butan-1-ol	59.2 $\pm$ 4.2
	2-Methyl-propan-1-ol	465.3 $\pm$ 46.9		2-Methyl-propan-1-ol	48.0 $\pm$ 4.6
	Ethyl formate	-		Butan-2-ol	64.7 $\pm$ 3.9
	Ethyl acetate	146.9 $\pm$ 13.7		Propan-2-one	40.1 $\pm$ 4.8
	Isopropyl acetate	-		2-Butanone	19.1 $\pm$ 8.9
	Methyl acetate	352.0 $\pm$ 41.2		Ethyl formate	-
	Acetonitrile	46.9 $\pm$ 5.2		Methyl acetate	36.3 $\pm$ 4.1
	Propan-2-one	30.8 $\pm$ 17.5		Ethyl acetate	11.3 $\pm$ 6.5

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
Celecoxib	Ethyl acetate	93.5 $\pm$ 1.8	Melatonin	Methanol	88.7 $\pm$ 1.3
	Propyl acetate	-		Ethanol	88.5 $\pm$ 0.5
	Isopropyl acetate	-		Propan-1-ol	84.9 $\pm$ 1.6
	Isobutyl acetate	-		Butan-1-ol	80.2 $\pm$ 1.7
	Acetonitrile	95.9 $\pm$ 0.3		2-Methyl-propan-1-ol	73.3 $\pm$ 2.9
	Methanol	80.1 $\pm$ 3.4		Pentan-1-ol	81.3 $\pm$ 0.6
	Ethanol	79.9 $\pm$ 3.7		Hexan-1-ol	78.3 $\pm$ 1.1
	Propan-1-ol	66.4 $\pm$ 3.7		Methyl acetate	28.2 $\pm$ 20.8
	Propan-2-ol	67.1 $\pm$ 1.1		Ethyl acetate	30.6 $\pm$ 9.3
	Butan-1-ol	50.5 $\pm$ 4.5		Propyl acetate	-
	2-Methyl-propan-1-ol	16.1 $\pm$ 3.8		Butyl acetate	49.2 $\pm$ 12.6
	Butan-2-ol	61.7 $\pm$ 3.0		Pentyl acetate	-
	Pentan-1-ol	46.9 $\pm$ 6.2			
Kojic acid	Methanol	61.8 $\pm$ 3.9	Topiramate	2-Methoxyethanol	-
	Ethanol	59.0 $\pm$ 4.5		2-Ethoxyethanol	-
	Propan-1-ol	43.6 $\pm$ 5.6		2-Propoxyethanol	-
	Ethyl acetate	133.6 $\pm$ 11.5		2-Butoxyethanol	-
	2-Methoxyethanol	-		Methanol	94.7 $\pm$ 0.9
	2-Ethoxyethanol	-		Ethanol	
	1,4-Dioxane	38.1 $\pm$ 3.6		Propan-1-ol	85.8 $\pm$ 1.5
	N,N-Dimethylacetamide	85.1 $\pm$ 3.7		Propan-2-ol	85.8 $\pm$ 1.9
	DMSO	83.6 $\pm$ 2.8		Butan-1-ol	78.2 $\pm$ 2.3
	Acetic acid	-		2-Methyl-propan-1-ol	66.1 $\pm$ 6.2
	NMP	89.6 $\pm$ 3.2		Pentan-1-ol	73.5 $\pm$ 1.5



Drug	Solvent	APD ± SD	Drug	Solvent	APD ± SD		
	N,N-Dimethylformamide	75.5 ± 3.9		3-Methyl-butan-1-ol	-		
	Propan-2-one	43.2 ± 6.1		Hexan-1-ol	70.5 ± 2.2		
	Water	90.1 ± 3.6		Heptan-1-ol	45.9 ± 4.2		
Pyrazinamide	Water	80.4 ± 3.8	Etodolac	Propan-1-ol	95.1 ± 1.3		
	Pentan-1-ol	14.1 ± 9.8		Propan-2-ol	94.8 ± 0.9		
	3-Methyl-butan-1-ol	-		Butan-1-ol	95.1 ± 1.3		
	Cyclohexanone	83.0 ± 11.5		2-Methyl-propan-1-ol	92.8 ± 0.8		
	Hexan-1-ol	7.5 ± 3.6		Methyl acetate	84.4 ± 3.2		
	Heptan-1-ol	99.9 ± 11.7		Butyl acetate	92.0 ± 1.7		
	Octan-1-ol	16.5 ± 4.7		Isobutyl acetate	-		
	Ethyl formate	-		Pentyl acetate	-		
	Methyl acetate	123.6 ± 26.6		Isopentyl acetate	-		
	Propane-1,2-diol	60.9 ± 7.8		Toluene	17.7 ± 9.9		
	Propyl acetate	-		Propan-2-one	94.3 ± 1.5		
	Butyl acetate	99.9 ± 11.4		Dichloromethane	64.0 ± 1.7		
	Riluzole	Ethanol		98.4 ± 0.8	Prednisolone form II	Methanol	28.0 ± 16.9
		Propan-1-ol		98.5 ± 0.7		Ethanol	28.8 ± 17.1
Butan-1-ol		98.5 ± 0.7	Propan-1-ol	25.7 ± 16.2			
Pentan-1-ol		98.7 ± 0.7	Propan-2-ol	30.9 ± 21.3			
Propan-2-one		98.2 ± 0.7	Butan-1-ol	29.8 ± 19.4			
Pentyl acetate		-	Methyl acetate	1055.1 ± 133.4			
Isopropyl acetate		-	Ethyl acetate	477.5 ± 84.5			
N,N-Dimethylacetamide		79.5 ± 2.7	Propyl acetate	-			
2-Methoxyethanol		-	Propan-2-one	193.0 ± 33.4			

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
	2-Propoxyethanol	-		1,4-Dioxane	15.0 $\pm$ 11.6
	Acetonitrile	99.3 $\pm$ 0.2		Tetrahydrofuran	45.5 $\pm$ 7.2
Doxifluridine	Methanol	21.6 $\pm$ 15.5	Flurbiprofen	Propan-1-ol	96.9 $\pm$ 0.6
	Ethanol	95.2 $\pm$ 29.0		Propan-2-ol	97.3 $\pm$ 0.5
	Propan-1-ol	220.6 $\pm$ 15.2		Butan-1-ol	96.9 $\pm$ 0.6
	Butan-1-ol	312.1 $\pm$ 8.5		2-Methyl-propan-1-ol	95.7 $\pm$ 0.6
	2-Methyl-propan-1-ol	565.6 $\pm$ 84.6		3-Methyl-butan-1-ol	-
	Pentan-1-ol	301.2 $\pm$ 16.1		Propyl acetate	-
	Hexan-1-ol	309.0 $\pm$ 18.3		Methyl tert-butyl ether	97.5 $\pm$ 0.8
	Octan-1-ol	434.5 $\pm$ 62.1		iso-Propyl ether	-
	( $\pm$ )-2-Ethyl-1-Hexanol	-		Acetonitrile	94.3 $\pm$ 1.3
	Propan-2-one	63.5 $\pm$ 30.6		Octane	62.2 $\pm$ 1.9
	N,N-Dimethylformamide	81.9 $\pm$ 5.6		Heptane	73.2 $\pm$ 3.3
	DMSO	86.8 $\pm$ 5.6		Hexane	65.2 $\pm$ 1.9
	Ipriflavone	Methanol		65.6 $\pm$ 14.6	Domperidone
Ethanol		9.6 $\pm$ 7.2	Ethanol	12570.3 $\pm$ 521.5	
Propan-1-ol		27.9 $\pm$ 6.8	Propan-2-ol	12352.5 $\pm$ 496.8	
Butan-1-ol		40.2 $\pm$ 6.8	Propan-1-ol	9065.7 $\pm$ 209.0	
Pentan-1-ol		54.5 $\pm$ 3.2	Butan-1-ol	8699.9 $\pm$ 227.5	
Methyl acetate		52.6 $\pm$ 5.5	Acetonitrile	361993.4 $\pm$ 130948.1	
N,N-Dimethylformamide		39.2 $\pm$ 8.1	2-Methyl-propan-1-ol	1178.6 $\pm$ 245.1	
N,N-Dimethylacetamide		64.9 $\pm$ 1.6	N,N-Dimethylformamide	15269.0 $\pm$ 5269.3	
Propan-2-one		66.2 $\pm$ 4.6	DMSO	5619.1 $\pm$ 991.2	

Drug	Solvent	APD ± SD	Drug	Solvent	APD ± SD
	Acetonitrile	79.1 ± 5.5		N,N-Dimethylacetamide	1573.0 ± 46.8
	Dichloromethane	92.6 ± 1.3		Ethane-1,2-diol	9583.1 ± 433.8
	Toluene	90.5 ± 0.4		Water	2555.7 ± 808.1
Oxaprozín	Methanol	25.2 ± 3.5	Bezafibrate	Methanol	21.3 ± 8.0
	Ethanol	51.3 ± 4.4		Ethanol	22.0 ± 13.9
	Propan-1-ol	55.2 ± 2.2		Propan-1-ol	26.9 ± 10.0
	Butan-1-ol	54.2 ± 1.7		Propan-2-ol	6.7 ± 4.6
	Pentan-1-ol	61.4 ± 2.9		Butan-1-ol	21.7 ± 7.6
	Methyl Acetate	2.0 ± 1.1		2-Methyl-propan-1-ol	36.6 ± 3.2
	Ethyl Acetate	41.1 ± 3.2		Butan-2-ol	38.7 ± 8.4
	Propyl Acetate	-		Pentan-1-ol	39.5 ± 9.1
	Butyl Acetate	13.7 ± 3.4		3-Methyl-butan-1-ol	-
	Pentyl acetate	-		Ethyl Acetate	356.1 ± 23.2
	N,N-Dimethylformamide	80.8 ± 4.1		Propyl Acetate	-
	N,N-Dimethylacetamide	88.5 ± 3.3		Butyl Acetate	716.0 ± 49.4
	DMSO	83.8 ± 1.7		Methyl Propionate	-
				Butan-2-one	138.5 ± 3.5
		Cyclohexanone	24.0 ± 11.1		
		Acetonitrile	447.0 ± 153.4		
Vitamin K3	Dichloromethane	96.0 ± 0.4	Temozolomide	Methanol	1096.3 ± 229.0
	1,2-Dichloroethane	93.4 ± 0.6		Ethanol	2149.5 ± 89.1
	Methyl acetate	87.8 ± 0.4		Propan-1-ol	2423.3 ± 127.5
	Propan-2-one	89.8 ± 0.7		Propan-2-ol	4497.0 ± 688.1
	Acetonitrile	96.0 ± 0.4		Propan-2-one	1198.8 ± 31.8

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
	Butan-1-ol	68.0 $\pm$ 3.0		Acetonitrile	124.0 $\pm$ 11.4
	Propan-1-ol	65.0 $\pm$ 3.5		Ethyl acetate	2594.7 $\pm$ 141.0
	Propan-2-ol	64.2 $\pm$ 1.0		DMSO	236.3 $\pm$ 50.8
	Cyclohexane	94.6 $\pm$ 0.6		1,4-Dioxane	189.5 $\pm$ 45.5
	Methanol	31.6 $\pm$ 8.1		N,N-Dimethylformamide	642.6 $\pm$ 18.8
Griseofulvin	Methanol	703.7 $\pm$ 63.5	Bisacodyl	Methanol	2632.8 $\pm$ 264.4
	Ethanol	601.9 $\pm$ 104.4		Ethanol	1991.1 $\pm$ 284.0
	Propan-1-ol	562.7 $\pm$ 85.7		Propan-1-ol	312.2 $\pm$ 300.2
	Butan-1-ol	667.3 $\pm$ 107.6		Propan-2-ol	2162.5 $\pm$ 300.7
	2-Methyl-propan-1-ol	863.0 $\pm$ 96.6		Butan-1-ol	1451.5 $\pm$ 236.2
	Methyl acetate	135.0 $\pm$ 34.5		1,4-Dioxane	120.0 $\pm$ 20.3
	Ethyl acetate	71.3 $\pm$ 36.4		N,N-Dimethylformamide	759.6 $\pm$ 55.3
	Propyl acetate	-		NMP	455.8 $\pm$ 52.4
	Butyl acetate	207.4 $\pm$ 65.6		Ethyl Acetate	163.5 $\pm$ 24.9
	iso-Propyl acetate	-		Propan-2-one	137.9 $\pm$ 19.0
	Iso butyl acetate	-		Acetonitrile	27.8 $\pm$ 8.4
	Acetonitrile	69.9 $\pm$ 3.9		Toluene	142.1 $\pm$ 37.2
	Lansoprazole	Methanol		92.3 $\pm$ 0.2	Nintedanib
Ethanol		86.9 $\pm$ 1.4	Ethanol	1066.1 $\pm$ 169.8	
Propan-1-ol		81.9 $\pm$ 2.8	Propan-1-ol	726.5 $\pm$ 66.2	
Propan-2-ol		69.5 $\pm$ 3.1	Propan-2-ol	1778.5 $\pm$ 149.3	
Butan-1-ol		76.5 $\pm$ 1.9	Butan-1-ol	1383.5 $\pm$ 186.8	
2-Methyl-propan-1-ol		65.8 $\pm$ 3.0	Butan-1-ol	184.5 $\pm$ 11.4	
Propan-2-one		53.8 $\pm$ 7.4	2-Methyl-propan-1-ol	1731.7 $\pm$ 252.9	

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
	Acetonitrile	80.3 $\pm$ 2.1		N,N-Dimethylformamide	1205.5 $\pm$ 50.5
	Methyl acetate	21.9 $\pm$ 7.6		N,N-Dimethylacetamide	283.0 $\pm$ 33.9
	Ethyl acetate	52.3 $\pm$ 2.5		1,4-Dioxane	512.5 $\pm$ 16.6
	Propyl acetate	-		Dichlormethane	14.2 $\pm$ 3.3
	Butyl acetate	26.6 $\pm$ 10.1			
Antipyrine	Methanol	97.8 $\pm$ 0.6	Indapamide	Methanol	71.3 $\pm$ 1.0
	Ethanol	98.0 $\pm$ 0.6		Ethanol	74.3 $\pm$ 0.7
	Propan-1-ol	98.1 $\pm$ 0.6		Propan-1-ol	66.3 $\pm$ 1.3
	Propan-2-ol	97.5 $\pm$ 0.6		Propan-2-ol	44.9 $\pm$ 13.6
	Butan-1-ol	97.9 $\pm$ 0.6		Propan-2-one	79.0 $\pm$ 3.1
	2-Methyl-propan-1-ol	97.7 $\pm$ 0.6		Acetonitrile	75.9 $\pm$ 8.1
	Propan-2-one	91.5 $\pm$ 1.0		Ethyl acetate	124.3 $\pm$ 113.1
	Methyl acetate	82.3 $\pm$ 4.8		2-Butanone	70.7 $\pm$ 2.8
	Ethyl acetate	89.8 $\pm$ 3.0		Toluene	12595 $\pm$ 6780.5
	Water	99.8 $\pm$ 0.01		Cyclohexane	4227.1 $\pm$ 2031.5
Troloxerutin	Methanol	1005.0 $\pm$ 29.9	Perphenazine	Propan-1-ol	90.5 $\pm$ 2.3
	Ethanol	1017.8 $\pm$ 218.8		Butan-1-ol	91.2 $\pm$ 1.8
	Propan-1-ol	1343.1 $\pm$ 128.6		Methyl acetate	23.4 $\pm$ 17.9
	Propan-2-ol	1613.1 $\pm$ 71.7		Ethyl acetate	70.1 $\pm$ 5.6
	Butan-1-ol	2001.3 $\pm$ 201.9		Propyl acetate	-
	2-methyl-1-Propanol	4231.5 $\pm$ 753.9		Pentyl acetate	-
	Butan-2-ol	1578.5 $\pm$ 89.3		2-Methoxyethanol	-
	Pentan-1-ol	2346.2 $\pm$ 753.9		2-Ethoxyethanol	-
	Propan-2-one	13345.9 $\pm$ 2863.6		N,N-Dimethylformamide	43.1 $\pm$ 12.6

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
	Acetonitrile	8736.2 $\pm$ 2804.7		N,N-Dimethylacetamide	76.1 $\pm$ 0.4
	1,4-Dioxane	779.1 $\pm$ 37.7		Propan-2-one	43.7 $\pm$ 19.2
Glibenclamide	Methanol	1213.9 $\pm$ 302.1	Dipyron	Methanol	82.8 $\pm$ 4.2
	Ethanol	984.6 $\pm$ 172.6		Ethanol	20.5 $\pm$ 13.5
	Propan-1-ol	1126.2 $\pm$ 190.3		Propan-1-ol	147.9 $\pm$ 22.0
	Propan-2-ol	1429.4 $\pm$ 331.1		Propan-2-ol	629.2 $\pm$ 31.6
	Butan-1-ol	839.4 $\pm$ 166.0		Butan-1-ol	579.9 $\pm$ 92.6
	Butan-2-ol	1491.7 $\pm$ 367.2		Butan-2-ol	619.4 $\pm$ 140.1
	Propan-2-one	623.3 $\pm$ 111.3		Propan-2-one	4243.6 $\pm$ 1205.2
	Acetonitrile	1030.3 $\pm$ 360.3		Ethyl Acetate	3704.5 $\pm$ 844.4
	Methyl Isobutyl Ketone	-		Methyl Acetate	9251.0 $\pm$ 2753.9
	Methyl Acetate	3857.2 $\pm$ 665.4		Water	98.9 $\pm$ 0.1
	Ethyl Acetate	2255.8 $\pm$ 364.9			
	Levetiracetam	Methanol		96.7 $\pm$ 0.6	Omeprazole
Ethanol		95.0 $\pm$ 1.0	Methanol	25.0 $\pm$ 6.1	
Propan-1-ol		89.8 $\pm$ 1.4	Ethanol	14.6 $\pm$ 9.5	
Propan-2-ol		87.8 $\pm$ 0.6	Butan-1-ol	11.7 $\pm$ 9.8	
Propan-2-one		73.2 $\pm$ 1.7	Acetonitrile	44.8 $\pm$ 5.1	
1,4-Dioxane		863.2 $\pm$ 76.7	Propan-2-one	109.1 $\pm$ 14.6	
Acetonitrile		90.7 $\pm$ 0.4	Ethyl acetate	155.7 $\pm$ 21.0	
Ethyl Acetate		46.5 $\pm$ 4.9	Tetrahydrofuran	47.0 $\pm$ 17.7	
Toluene		20.4 $\pm$ 15.2			
Cyclohexane		863.2 $\pm$ 79.7			

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
Uridine	Methanol	32.1 $\pm$ 20.8	Vinpocetine	Methanol	461.9 $\pm$ 16.8
	Ethanol	175.2 $\pm$ 50.8		Ethanol	189.7 $\pm$ 9.8
	Propan-1-ol	187.2 $\pm$ 44.4		Propan-1-ol	77.0 $\pm$ 7.7
	Propan-2-ol	123.0 $\pm$ 49.2		Propan-2-ol	220.9 $\pm$ 36.2
	Butan-1-ol	240.1 $\pm$ 78.1		Butan-1-ol	35.6 $\pm$ 14.3
	2-Methoxy Ethanol	-		Ethyl Acetate	36.5 $\pm$ 2.5
	2-Ethoxy Ethanol	-		Methyl Acetate	93.2 $\pm$ 28.5
	2-Propoxy Ethanol	-		Cyclohexane	86.2 $\pm$ 1.9
	2-Butoxy Ethanol	-		Butan-2-one	24.0 $\pm$ 7.3
	Water	98.6 $\pm$ 0.3			
	N,N-Dimethylformamide	80.6 $\pm$ 5.8			
	Ethane-1,2-diol	81.6 $\pm$ 3.1			
Clozapine	Methanol	49.7 $\pm$ 19.5	Clozapine	Chloroform	94.1 $\pm$ 2.6
	Ethanol	58.9 $\pm$ 16.8		Ethyl formate	-
	Propan-1-ol	72.4 $\pm$ 9.8		Methyl acetate	42.7 $\pm$ 11.5
	Propan-2-ol	37.2 $\pm$ 20.2		Ethyl acetate	71.2 $\pm$ 6.5
	Butan-1-ol	72.5 $\pm$ 10.1		Propyl acetate	-
	2-Methyl-propan-1-ol	60.8 $\pm$ 15.4		Butyl acetate	70.4 $\pm$ 7.1
	Butan-2-ol	56.9 $\pm$ 18.7		Pentyl acetate	-
	Pentan-1-ol	78.2 $\pm$ 9.2		2-Methoxyethanol	-
	3-Methyl-butan-1-ol	-		2-Ethoxyethanol	-
	Propan-2-one	65.1 $\pm$ 3.8		2-Propoxyethanol	-
	Butan-2-one	77.0 $\pm$ 3.6		NMP	62.2 $\pm$ 1.8
	Acetonitrile	46.8 $\pm$ 13.2		1,2-Dichloroethane	48.7 $\pm$ 2.6

Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
	N,N-Dimethylformamide	71.1 $\pm$ 7.0		Benzene	67.9 $\pm$ 2.9
	Tetrahydrofuran	88.5 $\pm$ 3.8		Toluene	55.2 $\pm$ 5.1
	DMSO	51.9 $\pm$ 3.3			
Chlorphenesin	Methanol	96.6 $\pm$ 0.2	Chrysin	Hexan-1-ol	785025.8 $\pm$ 269992.2
	Ethanol	97.0 $\pm$ 0.2		Ethyl Acetate	588.6 $\pm$ 102.3
	Propan-1-ol	95.6 $\pm$ 0.4		Propan-2-one	429.7 $\pm$ 54.6
	Butan-1-ol	96.1 $\pm$ 0.4		Methanol	1785.7 $\pm$ 209.4
	Butan-2-ol	96.8 $\pm$ 0.4		Ethanol	591.3 $\pm$ 112.2
	2-Methyl-propan-1-ol	94.1 $\pm$ 1.3		Propan-1-ol	476.9 $\pm$ 67.7
	Methyl Acetate	88.5 $\pm$ 4.5		Propan-2-ol	427.8 $\pm$ 59.9
	Ethyl Acetate	94.3 $\pm$ 2.1		Butan-1-ol	419.6 $\pm$ 59.6
	Propyl Acetate	-		N,N-dimethylformamide	88.2 $\pm$ 54.1
	Tetrahydrofuran	96.2 $\pm$ 0.4		Water	3436865.0 $\pm$ 3363647.0
	1,4-Dioxane	96.6 $\pm$ 0.9			
	Propan-2-one	95.5 $\pm$ 0.9			
Florfenicol Form A	Ethanol	5.5 $\pm$ 3.2	Lidocaine	Ethanol	99.1 $\pm$ 0.3
	Propan-1-ol	35.3 $\pm$ 6.3		Propan-1-ol	99.2 $\pm$ 0.4
	Butan-1-ol	172.3 $\pm$ 20.3		Propan-2-ol	99.2 $\pm$ 0.4
	Propan-2-ol	104.4 $\pm$ 12.3		Butan-1-ol	99.2 $\pm$ 0.4
	2-Methyl-propan-1-ol	419.6 $\pm$ 39.0		2-Methyl-propan-1-ol	99.1 $\pm$ 0.4
	3-Methyl-1-butanol	-		Propan-2-one	98.6 $\pm$ 0.4
	2-Ethyl-1-hexanol	-		Methyl Acetate	97.6 $\pm$ 0.6
	Propanoic acid	-		Ethyl Acetate	98.9 $\pm$ 0.4



Drug	Solvent	APD $\pm$ SD	Drug	Solvent	APD $\pm$ SD
Lidocaine	Ethanol	99.1 $\pm$ 0.3	Norfloxacin	Ethanol	121.0 $\pm$ 56.6
	Propan-1-ol	99.2 $\pm$ 0.4		Butan-1-ol	136.6 $\pm$ 86.1
	Propan-2-ol	99.2 $\pm$ 0.4		Propan-2-ol	693.1 $\pm$ 120.5
	Butan-1-ol	99.2 $\pm$ 0.4		Propan-2-one	356.4 $\pm$ 52.3
	2-Methyl-propan-1-ol	99.1 $\pm$ 0.4		Acetonitrile	219.7 $\pm$ 58.6
	Propan-2-one	98.6 $\pm$ 0.4		Ethyl acetate	711.3 $\pm$ 280.3
	Methyl Acetate	97.6 $\pm$ 0.6		Hexane	76.7 $\pm$ 6.1
	Ethyl Acetate	98.9 $\pm$ 0.4		N,N-dimethylformamide	512.7 $\pm$ 243.9
Ganciclovir form I	Methanol	3895.9 $\pm$ 1345.4	Empagliflozin	Ethanol	34964.8 $\pm$ 4021.4
	Ethanol	2427.2 $\pm$ 1074.4		N,N-dimethylformamide	2172.9 $\pm$ 514.8
	Propan-1-ol	1263.7 $\pm$ 657.0		Ethyl acetate	194200.3 $\pm$ 50989.4
	Propan-2-ol	3145.6 $\pm$ 1306.4		Formamide	-
	Butan-1-ol	1133.2 $\pm$ 573.0		Butan-1-ol	39543.4 $\pm$ 12732.3
	Acetonitrile	8716.7 $\pm$ 2079.3		Propan-1-ol	49252.4 $\pm$ 8775.9
	Propan-2-one	780801.7 $\pm$ 13197.2		Acetonitrile	65810.0 $\pm$ 25993.3
	Ethyl acetate	635898.4 $\pm$ 131976.2		Ethane-1,2-diol	8250.7 $\pm$ 514.8
	Toluene	884317.1 $\pm$ 169475.9		Methanol	8824.9 $\pm$ 361.2
Praziquantel	Propyl acetate	-	Praziquantel	2-Propoxyethanol	-
	Butyl acetate	55.8 $\pm$ 4.6		2-Butoxyethanol	-
	Ethanol	83.2 $\pm$ 1.2		N,N-Dimethylacetamide	47.2 $\pm$ 3.0
	Propan-1-ol	84.0 $\pm$ 1.9		N,N-Dimethylformamide	24.8 $\pm$ 6.9
	Butan-1-ol	84.5 $\pm$ 1.4		Ethane-1,2-diol	10.3 $\pm$ 3.0
	2-Ethoxyethanol	-			

a The s values were not reported due to there are no report the parameters of Catalan, Hansen or Abraham for solvent.

## REFERENCES

1. A. Jouyban, *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*, CRC Press, Boca Raton (FL), 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781439804889>.
2. F. Martinez, A. Jouyban, W.E. Acree Jr, Pharmaceutical's solubility is still nowadays widely studied everywhere, *Pharm. Sci.*, **23**, 1-2 (2017). DOI: <https://doi.org/10.15171/PS.2017.01>.
3. R. Sanghvi, R. Narazaki, S.G. Machatha, S.H. Yalkowsky, Solubility improvement of drugs using N-methyl pyrrolidone, *AAPS PharmSciTech*, **9**, 366-376 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9050-z>.
4. S.H. Yalkowsky, *Solubility and solubilization in aqueous media*, American Chemical Society and Oxford University Press, New York (NY), 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0047424>.
5. W. Li, A. Farajtabar, R. Xing, Y. Zhu, H. Zhao, Equilibrium solubility determination, solvent effect and preferential solvation of amoxicillin in aqueous co-solvent mixtures of N, N-dimethylformamide, isopropanol, N-methyl pyrrolidone and ethylene glycol, *J. Chem. Thermodyn.*, **142**, 106010 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.106010>.
6. T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development, *J. Pharm. Pharmacol.*, **62**, 1607-1621 (2010), DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x>.
7. T. Takagi, C. Ramachandran, M. Bermejo, S. Yamashita, L.X. Yu, G.L. Amidon, A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan, *Mol. Pharm.*, **3**, 631-643 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1021/mp0600182>.
8. A. Jouyban, M. Fakhree, A. Shayanfar, Solubility prediction methods for drug/drug like molecules, *Recent Pat. Chem. Eng.*, **1**, 220-231 (2008).
9. A. Konczol, G. Dargo, Brief overview of solubility methods: Recent trends in equilibrium solubility measurement and predictive models, *Drug Discov. Today*, **27**, 3-17 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.001>.

10. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeny, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Del. Rev.*, **46**, 3-26 (2001). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
11. J. Alsenz, M. Kansy, High throughput solubility measurement in drug discovery and development, *Adv. Drug Del. Rev.*, **59**, 546-567 (2007). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.007>.
12. S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B*, **5**, 442-453 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
13. S.S. Ren, B.D. Anderson, What determines drugs solubility in lipid vehicles: Is it predictable?, *Adv. Drug Del. Rev.*, **60**, 638-656 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.015>.
14. W.L. Jorgensen, E.M. Duffy, Prediction of drug solubility from structure, *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 355-366 (2002). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00008-X).
15. M. Mirmehrabi, S. Rohani, L. Perry, Thermodynamic modeling of activity coefficient and prediction of solubility: Part 1. Predictive models, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 790-797 (2005). DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.20576>.
16. A. Jouyban, E. Rahimpour, Z. Karimzadeh, A new correlative model to simulate the solubility of drugs in mono-solvent systems at various temperatures, *J. Mol. Liq.*, **343**, 117587 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117587>.
17. X. Ji CL, J. Li, B. Hou, L. Zhou, Ch. Xie, J. Gong, W. Chen, J. Zhao, Measurement and comprehensive analysis of the solubility of abacavir in twelve pure solvents, *J. Mol. Liq.*, **338**, 116603 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116603>.
18. Zh. Wang, J. Dong, Zh. Li, L. Ding, B. Wang, Measurement and correlation of the solubility of antipyrine in ten pure and water + ethanol mixed solvents at temperatures from (288.15 to 328.15) K, *J. Mol. Liq.*, **268**, 256-265 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.061>.

19. M. Liu, S. Wang, C. Qu, Z. Zhang, Y. Qu, Solubility determination and thermodynamic properties of bezafibrate in pure and binary mixed solvents, *J. Chem. Eng. Data*, **65**, 2156-2169 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00025>.
20. W. Hong, S. Jia, Z. Li, W. Li, Z. Gao, Solubility determination and thermodynamic correlation of chlorphenesin in 12 pure solvents from 288.15 to 328.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, **66**, 822-831 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00900>.
21. Y. Wu, C. Wu, S. Yan, B. Hu, Solubility of bisacodyl in pure solvent at various temperatures: data correlation and thermodynamic property analysis, *J. Chem. Eng. Data*, **65**, 43-48 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00728>.
22. Y. Wu, J. Wu, J. Wang, J. Gao, Effect of solvent properties and composition on the solubility of ganciclovir form I, *J. Chem. Eng. Data*, **64**, 1501-1507 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b01080>.
23. S. Li, Y. Liu, F. Yin, X. Ye, Solubility measurement and thermodynamic properties of levetiracetam in pure and mixed solvents, *J. Chem. Eng. Data*, **63**, 4669-4681 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00720>.
24. Y. Zhao, H. Yang, Z. Shang, T. Gong, X. Zhang, S. Wu, Solubility determination and correlation of glibenclamide in 11 monosolvents and (acetone + acetonitrile) binary solvents from 283.15 K to 323.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, **64**, 189-201 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00717>.
25. G. Hu, H. Li, X. Wang, Y. Zhang, Measurement and correlation of griseofulvin solubility in different solvents at temperatures from (281.95 to 357.60) K, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 3969-3971 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1021/jc100030j>.
26. S. Wang, N. Chen, Y. Qu, Solubility of florfenicol in different solvents at temperatures from (278 to 318) K, *J. Chem. Eng. Data*, **56**, 638-641 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1021/jc1008284>.
27. C. L. Zhang, B. Y. Li, Y. Wang, Solubilities of norfloxacin in ethanol, 1-propanol, acetone, and chloroform from 294.15 to 318.15 K, *Can. J. Chem. Eng.*, **88**, 63-66 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1002/cjce.20247>.

28. K. Zhang, H. Shen, S. Xu, H. Zhang, M. Zhu, P. Shi, *et al.*, Thermodynamic study of solubility for pyrazinamide in ten solvents from T = (283.15 to 323.15) K, *J. Chem. Thermodyn.*, **112**, 204-212 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.04.014>.
29. Y. Hu, G. Wu, P. Gu, W. Yang, C. Wang, Z. Ding, *et al.*, Thermodynamic models for determination of the solubility of omeprazole in pure and mixture organic solvents from T = (278.15 to 333.15) K, *J. Chem. Thermodyn.*, **94**, 177-185 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.11.005>.
30. H. Niu, Z. Cao, X. Yang, J. Sha, Y. Li, T. Li, *et al.*, The solubility data, Hansen solubility parameter and dissolution thermodynamic properties of riluzole in twelve organic solvents, *J. Chem. Thermodyn.*, **162**, 106569 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2021.106569>.
31. Y. Wang, Y. Liu, S. Xu, Y. Liu, P. Yang, S. Du, *et al.*, Determination and modelling of troxerutin solubility in eleven mono-solvents and (1,4-dioxane+2-propanol) binary solvents at temperatures from 288.15 K to 323.15 K, *J. Chem. Thermodyn.*, **104**, 138-149 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.09.015>.
32. Y. Wu, J. Gao, S. Yan, C. Wu, B. Hu, The dissolution behavior and apparent thermodynamic analysis of temozolomide in pure and mixed solvents, *J. Chem. Thermodyn.*, **132**, 54-61 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.11.026>.
33. R. Li, X. Chen, G. He, C. Wu, Z. Gan, Z. He, *et al.*, The dissolution behaviour and thermodynamic properties calculation of praziquantel in pure and mixed organic solvents, *J. Chem. Thermodyn.*, **144**, 106062 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106239>.
34. J. Sha, T. Ma, R. Zhao, P. Zhang, R. Sun, G. Jiang, *et al.*, The dissolution behaviour and apparent thermodynamic analysis of doxifluridine in twelve pure solvents at various temperatures, *J. Chem. Thermodyn.*, **144**, 106073 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106062>.
35. Z. Cao, R. Zhang, X. Hu, J. Sha, G. Jiang, Y. Li, *et al.*, Thermodynamic modeling, Hansen solubility parameter and solvent effect of oxaprozin in thirteen pure solvents at different temperatures, *J. Chem. Thermodyn.*, **151**, 106239 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106073>.
36. Z. Huang, Y. Zun, Y. Gong, X. Hu, J. Sha, Y. Li, *et al.*, Solid-liquid equilibrium solubility, thermodynamic properties, solvent effect of Ipriflavone in twelve pure

- solvents at various temperatures, *J. Chem. Thermodyn.*, **150**, 106231 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106231>.
37. W. Hu, Z. Shang, N. Wei, B. Hou, J. Gong, Y. Wang, Solubility of benorilate in twelve monosolvents: Determination, correlation and COSMO-RS analysis, *J. Chem. Thermodyn.*, **152**, 106272 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106272>.
  38. R. Sun, H. He, Y. Wan, L. Li, J. Sha, G. Jiang, *et al.*, Kojic acid in fourteen mono-solvents: Solubility data, Hansen solubility parameter and thermodynamic properties, *J. Chem. Thermodyn.*, **152**, 106280 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106280>.
  39. J. Ma, H. Li, Z. Cao, J. Sha, R. Sun, H. He, *et al.*, Solid-liquid phase equilibrium of Nintedanib in ten pure solvents: Determination, thermodynamic analysis, model correlation and molecular simulation, *J. Chem. Thermodyn.*, **163**, 106595 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2021.106595>.
  40. S. Yu, Y. Cheng, S. Du, Y. Wang, F. Xu, W. Xing, Thermodynamic analysis of the solubility of clozapine in organic solvents, *J. Chem. Thermodyn.*, **158**, 106451 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2021.106451>.
  41. L. Ding, B. Wang, F. Wang, J. Dong, G. Zhou, H. Li, Measurement and correlation of the solubility of dipyrone in ten mono and water + ethanol mixed solvents at temperatures from (293.15 to 332.85) K, *J. Mol. Liq.*, **241**, 742-750 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.072>.
  42. S. Zong, J. Wang, Y. Xiao, H. Wu, Y. Zhou, Y. Guo, *et al.*, Solubility and dissolution thermodynamic properties of lansoprazole in pure solvents, *J. Mol. Liq.*, **241**, 399-406 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.037>.
  43. Y. Yu, F. Li, S. Long, L. Xu, G. Liu, Solubility, thermodynamic properties, HSP, and molecular interactions of vitamin K3 in pure solvents, *J. Mol. Liq.*, **317**, 113945 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113945>.
  44. G. Zhou, B. Wang, L. Ding, J. Dong, F. Wang, C. Feng, Measurement and correlation of the solubility of Lidocaine in eight pure and mixed solvents at temperatures from (292.15 to 332.15) K, *J. Mol. Liq.*, **242**, 168-174 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.110>.
  45. X. Hu, Y. Gong, Z. Cao, Z. Huang, J. Sha, Y. Li, *et al.*, Solubility, Hansen solubility parameter and thermodynamic properties of etodolac in twelve organic

- pure solvents at different temperatures, *J. Mol. Liq.*, **316**, 113779 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113779>.
46. R. Sun, Y. Wang, H. He, Y. Wan, L. Li, J. Sha, *et al.*, Solubility measurement, solubility behavior analysis and thermodynamic modelling of melatonin in twelve pure solvents from 278.15 K to 323.15 K, *J. Mol. Liq.*, **319**, 114139 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114139>.
  47. S. Guo, Z. Li, S. Du, C. Zhao, M. Wang, X. Su, *et al.*, Thermodynamic analysis and molecular dynamic simulation of solid-liquid phase equilibrium of imazapyr in twelve pure organic solvents, *J. Mol. Liq.*, **330**, 115631 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115631>.
  48. R. Sun, Y. Wen, H. He, L. Yuan, Y. Wan, J. Sha, *et al.*, Uridine in twelve pure solvents: Equilibrium solubility, thermodynamic analysis and molecular simulation, *J. Mol. Liq.*, **330**, 115663 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115663>.
  49. X. Su, C. Yu, P. Zhao, M. Wang, C. Zhao, M. Chen, *et al.*, Solid-liquid equilibrium and thermodynamic analysis of elastically bendable crystal celecoxib in thirteen pure solvents based on experiments and molecular simulation, *J. Mol. Liq.*, **338**, 116706 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116706>.
  50. C. Zhao, J. Lin, Y. Gao, S. Guo, R. Liu, S. Wu, Solid-liquid equilibrium behavior, thermodynamic analysis and molecular simulation of dimetridazole in twelve organic solvents, *J. Mol. Liq.*, **336**, 116252 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116252>.
  51. Y. Chong, Q. Liu, Z. Wang, L. Zhu, F. Guo, Y. Li, *et al.*, Solubility, MD simulation, thermodynamic properties and solvent effect of perphenazine (Form I) in eleven neat organic solvents ranged from 278.15 K to 318.15 K, *J. Mol. Liq.*, **348**, 118184 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118184>.
  52. L. Jia, J. Yang, P. Cui, D. Wu, S. Wang, B. Hou, *et al.*, Uncovering solubility behavior of Prednisolone form II in eleven pure solvents by thermodynamic analysis and molecular simulation, *J. Mol. Liq.*, **342**, 117376 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117376>.
  53. L. Yuan, Z. Cao, R. Sun, H. He, Y. Ren, H. Niu, *et al.*, Experimental measurement, thermodynamic analysis and molecular simulation of topiramate solubil-

- ity in fourteen mono-solvents at various temperatures, *J. Mol. Liq.*, **342**, 116992 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116992>.
54. Z. Yu Yw, M. Zhu, L. Zhou, Measurement and correlation of solubility and thermodynamic properties of vinpocetine in nine pure solvents and (ethanol + water) binary solvent, *J. Chem. Eng. Data*, **64**, 150-160 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00663>.
  55. Y. Cong CD, M. Wang, Zh. Jiang, K. Xing, Y. Bian, M. Wang, Investigation on the Hansen solubility parameter, solvent effect and thermodynamic analysis of indapamide dissolution and molecular dynamic simulation, *J. Mol. Liq.*, **334**, 116489 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116489>.
  56. B. Tian YF, X. Li, J. Yang, Zh. Ding, X. Huang, Q. Yin, Ch. Xie, H. Hao, Solution thermodynamic properties of flurbiprofen in twelve solvents from 283.15 to 323.15 K, *J. Mol. Liq.*, **296**, 111744 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111744>.
  57. P. Zhang CZ, R. Zhao, Y. Wan, Zh. Yang, R. He, Q. Chen, T. Li, B. Ren, Measurement and correlation of the solubility of florfenicol form A in several pure and binary solvents, *J. Chem. Eng. Data*, **63**, 2046-2055 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00043>.
  58. X. Dong Y. Cao, N. Wang, P. Wang, M. Li, Systematic study on solubility of chrysin in different organic solvents: the synergistic effect of multiple intermolecular interactions on the dissolution process, *J. Mol. Liq.*, **325**, 115180 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115180>.
  59. J. Ma, X. Huang, N. Wang, X. Li, Y. Bao, T. Wang, *et al.*, Solubility and thermodynamic mixing and dissolution properties of empagliflozin in pure and binary solvent systems, *J. Mol. Liq.*, **309**, 113004 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113004>.
  60. M.J.C. Zheng, G. Chen, A. Farajitabar, H. Zhao, Solubility modelling and solvent effect for domperidone in twelve green solvents, *J. Mol. Liq.*, **261**, 50-56 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.121>.
  61. J. Ma, X. Huang, N. Wang, X. Li, Y. Bao, T. Wang, *et al.*, Solubility and thermodynamic mixing and dissolution properties of empagliflozine in pure and binary solvent systems, *J. Mol. Liq.*, **309**, 113004 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113004>.



62. J.H. van't Hoff, L'équilibre chimique dans les systèmes gazeux on dissous à l'état dilué, *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles*, **20**, 239-302 (1886). DOI: <https://doi.org/10.1002/recl.18850041207>.
63. D.M. Stovall, C. Givens, S. Keown, K.R. Hoover, R. Barnes, C. Harris, *et al.*, Solubility of crystalline nonelectrolyte solutes in organic solvents: Mathematical correlation of 4-chloro-3-nitrobenzoic acid and 2-chloro-5-nitrobenzoic acid solubilities with the Abraham solvation parameter model, *Phys. Chem. Liq.*, **43**, 351-360 (2005). DOI: <https://doi.org/10.1080/00319100500111293>.
64. C.M. Hansen, *Hansen solubility parameters: A user's handbook*, CRC Press, Boca Raton (FL), 2007.
65. J. Catalan, Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 5951-5960 (2009). DOI: <https://doi.org/10.1021/jp8095727>.
66. A. Hatefi, A. Jouyban, E. Mohammadian, W.E. Acree, Jr., E. Rahimpour, Prediction of paracetamol solubility in cosolvency systems at different temperatures, *J. Mol. Liq.*, **273**, 282-289 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.031>.
67. E. Rahimpour, E. Mohammadian, W.E. Acree, Jr., A. Jouyban, Computational tools for solubility prediction of celecoxib in the binary solvent systems, *J. Mol. Liq.*, **299**, 112129 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112129>.
68. E. Rahimpour, W.E. Acree, Jr., A. Jouyban, Prediction of sulfonamides' solubilities in the mixed solvents using solvation parameters, *J. Mol. Liq.*, **339**, 116269 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116269>.
69. <http://www.ufz.de/lserd>.

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

S. Khezri, P. Jafari, A. Jouyban, Drugs solubility prediction in mono-solvents at various temperatures using a minimum number of experimental data points, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 908-954(2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110747>

# O uso do hidróxido de vanádio bivalente para a eliminação da sucralose das águas naturais e de esgoto da indústria alimentar e farmacêutica. Uma avaliação teórica

Volodymyr V. Tkach<sup>1,2\*</sup>, Marta V. Kushnir<sup>1</sup>, Nataliia M. Storoshchuk<sup>1</sup>, Sílvio C. de Oliveira<sup>2</sup>, Olga V. Luganska<sup>3</sup>, Vira V. Kopiika<sup>3</sup>, Nataliia V. Novosad<sup>3</sup>, Svitlana M. Lukanova<sup>1</sup>, Yana G. Ivanushko<sup>4</sup>, Valentyna G. Ostapchuk<sup>4</sup>, Svitlana P. Melnychuk<sup>4</sup>, Petro I. Yagodynets<sup>1</sup>, José I. Ferrão de Paiva Martins<sup>5</sup>, Lucinda Vaz dos Reis<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrânia.

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

<sup>3</sup>Universidade Nacional de Zaporizhzhia, 69600, Rua de Zhukovsky, 66, Zaporizhzhya, Ucrânia.

<sup>4</sup>Universidade Estatal de Medicina de Bucovina, 58001, Praça Teatral, 9, Chernivtsi, Ucrânia.

<sup>5</sup>Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 4200-465, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, Porto, Portugal.

<sup>6</sup>Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Folhadela, Vila Real, Portugal.

\*Correio eletrônico: [nightwatcher2401@gmail.com](mailto:nightwatcher2401@gmail.com)

Recebido: 24 de março de 2022

Revisado: 8 de maio de 2023

Aceto: 14 de maio de 2023

## RESUMO

**Introdução:** a sucralose é um adoçante, frequentemente usado nas indústrias alimentar e farmacêutica como corretor de sabor, mas que, por ser um composto cloroorgânico, não é ambientalmente acessível, razão por que o desenvolvimento de um sistema de eliminação da sucralose das águas de esgoto é realmente atual. **Metodologia:** o sistema da conversão eletroquímica da sucralose em desoxigalactossacaroses, mediante um processo eletroquímico, assistido pelo hidróxido de vanádio (II) tem sido avaliado teoricamente. O modelo matemático correspondente tem sido desenvolvido e analisado mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações. **Resultados:** a presença do hidróxido de vanádio bivalente tem efeito cata-

lítico para a degradação da sucralose. O estado estacionário se estabelece facilmente e se mantém firmemente, providenciando uma transformação rápida da sucralose em compostos mais biologicamente acessíveis. Quanto à instabilidade oscilatória, esta realizar-se-á com menor probabilidade que no caso da dechlorinação direta. **Conclusão:** o hidróxido de vanádio pode ser usado para a eliminação catódica da sucralose com a sua conversão em desoxigalactossacaroses com eficácia.

**Palavras-chave:** Sucralose, conversão eletroquímica, prevenção da poluição atmosférica, oscilações eletroquímicas, estado estacionário estável.

## SUMMARY

### The use of bivalent vanadium hydroxide for sucralose elimination from food and pharmaceutical industry wastewater. A theoretical evaluation

**Introduction:** Sucralose is a sweetener, frequently used in food and pharmaceutical industries as a taste corrector, but, being a chloroorganic compound, it isn't environmentally safe, reason why the development of a system with sucralose removal from wastewater is really actual. **Methodology:** The system with electrochemical sucralose conversion into desoxygalactosaccharoses by means of electrochemical process, assisted by vanadium (II) hydroxide has been theoretically evaluated. The correspondent mathematical model has been developed and analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis **Results:** The presence of vanadium (II) hydroxide has catalytic effect for the sucralose degradation. The stable steady-state is easy to obtain and maintain, providing a rapid sucralose transformation to more "green" products. As for the oscillatory behavior, it will be less probable than in the case of the direct dechlorination. **Conclusion:** Vanadium hydroxide may be used efficiently for the cathodic sucralose elimination with its conversion to desoxygalactosaccharoses.

**Keywords:** Sucralose, electrochemical conversion, atmosphere pollution prevention, electrochemical oscillations, stable steady-state.

## RESUMEN

El uso do hidróxido de vanadio bivalente para la eliminación de la sucralosa de las aguas naturales y residuales de las industrias alimentaria y farmacéutica. Una evaluación teórica

**Introducción:** la sucralosa es un edulcorante usado con frecuencia en las industrias alimenticia y farmacéutica como corrector de sabor, pero por ser un compuesto cloroorgánico, no es ambientalmente accesible, por lo que el desarrollo de un sistema de su eliminación es realmente actual. **Metodología:** el sistema de conversión electroquímica de la sucralosa en desoxigalactosacarosas, mediante un proceso electroquímico, asistido por el hidróxido de vanadio bivalente ha sido evaluado teóricamente. El modelo matemático correspondiente ha sido desarrollado y analizado mediante la teoría de estabilidad lineal y análisis de bifurcaciones. **Resultados:** el hidróxido de vanadio bivalente tiene efecto catalítico para la degradación de la sucralosa y su conversión en compuestos más biológicamente accesibles. La inestabilidad oscilatoria se realiza con menor probabilidad en relación con la dechlorinación directa. **Conclusión:** el hidróxido de vanádio puede ser usado para la eliminación catódica de la sucralosa con su conversión en desoxigalactosacarosas con eficacia.

**Palabras clave:** Sucralosa, conversión eletroquímica, prevención de la polución atmosférica, oscilaciones electroquímicas, estado estacionario estable.

## INTRODUÇÃO

Sucralose, ou seja, (2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-[(2R,3S,4S,5S),2,5-bis(clorometil)-3,4,-dihidroioxolan-2-il]oxi-5-cloro-6-hidroximetiloxan-3,4-diol, (número CAS 259-952-2, M=397,6 g/mol, Fig. 1) é um dos edulcorantes mais usados em Portugal e em toda a União Europeia nas indústrias alimentar e farmacêutica, como corretor de sabor [1-5]. O seu número de registro é E955. Trata-se de um derivado triclorossubstituído da galactosacarose, que tem o dobro do dulçor da sacarina, o triplo do dulçor do aspártamo e é até mil vezes mais doce que o açúcar comum.

Sucralose é considerada segura para uso de diabéticos e de desportistas. Mas, embora o seja, a sua ação nociva para a saúde humana e para o ambiente ainda está pouco explo-

rada. Outrossim, como a sucralose não é biodegradável, ela se acumula no ambiente [6, 7]. Além disso, a sucralose, quando se descompõe termicamente ou com ação de algumas bactérias, se transforma em compostos tóxicos como dioxinas e tetraclorodibenzofuranos. Ademais, um estudo recente [8] comprova que a sucralose pode entrar no leite materno e comprometer o desenvolvimento de microbiota intestinal dos bebês. Não se deve esquecer, ainda, que a sucralose também faz parte do grupo de compostos halogenorgânicos (Fig. 2). Destarte, o desenvolvimento de um método da eliminação da sucralose do ambiente, principalmente das águas de esgoto e subterrâneas, é realmente atual [9-12].

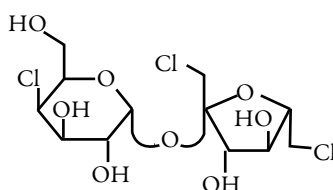


Fig. 1. Sucralose

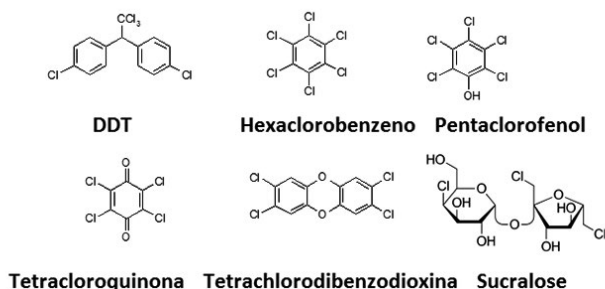
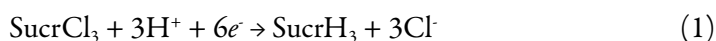


Fig. 2. Sucralose entre os compostos cloroorgânicos

Haja vista o requisito de um potencial anódico alto para os processos Fenton e análogos [13, 14], estes não serão ambientalmente compatíveis com a eliminação da sucralose, já que isto implica o formarem-se os compostos tóxicos de cloro nos estados de oxidação positivos. Destarte, os processos catódicos são mais aplicáveis para isto.

A deshalogenização catódica da sucralose, assim como dos outros compostos cloroorgânicos realizar-se-ia, perfeitamente, num sistema, análogo ao descrito em [15, 16]. Nisto, em meio fortemente ácido, poder-se-ia conduzir uma reação de troca iônica conforme (1):

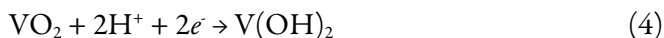


Uma das desvantagens sérias deste processo é a sua concorrência com a evolução de hidrogênio (2)



que soem ocupar os sítios ativos da reação principal. Outra desvantagem é o uso dos valores do pH assaz altos para iniciar esta reação.

Ambos os problemas ter-se-iam resolvido, usando-se o oxihidróxido de vanádio como modificador de eléctrodo, que consegue catalisar a reação conforme (3 – 4):



Por outro lado, o desenvolvimento de novos processos de eletrossíntese, eletroanálise e conversão eletroquímica requer a investigação teórica *a priori* do comportamento do sistema. Esta investigação permite resolver problemas como:

- a incerteza acerca de alguns detalhes do processo eletroanalítico (como se faz em condições concretas a eletrorredução, quais são os modificadores, que se poderiam usar lá);
- a possibilidade de aparição de instabilidades, características para a eletrooxidação de compostos orgânicos, inclusive a eletropolimerização [17-19].

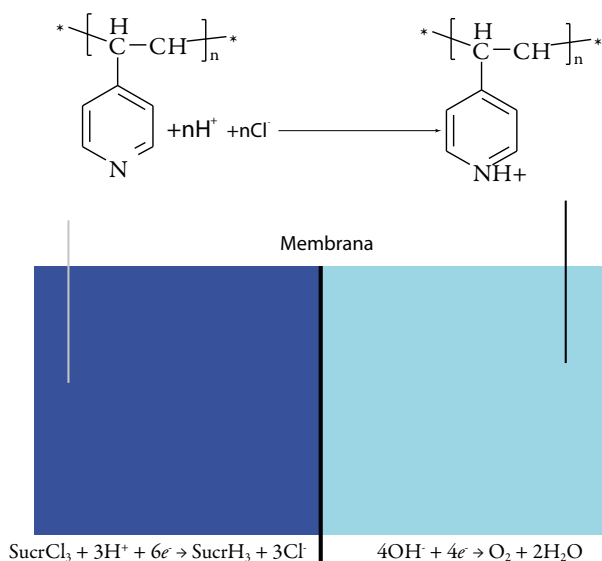
Destarte, o objetivo geral deste trabalho é avaliar o desempenho da conversão eletroquímica da sucralose por meio de um processo catódico, assistido pelo oxihidróxido de vanádio. Outrossim, o comportamento deste sistema comparar-se-á com o dos semelhantes [20, 21].

## O SISTEMA E O SEU MODELO

Este processo já tem sido usado para outros compostos cloroorgânicos (como cloroarenos e ácido tricloroacético), por isso será compatível também para a sucralose. No decorrer da reação catódica, a sucralose transformar-se-á em desoxihexoses e íon cloreto.

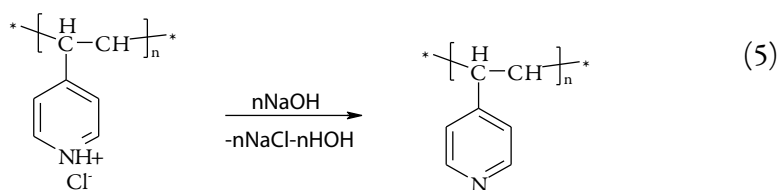
Para evitar a difusão deste para o compartimento anódico com a subsequente evolução de cloro, usa-se eletrólise de membrana, que impeça a passagem do cloreto para o

ânodo. Como o eletrólito anódico não contém íons simples, capazes de oxidar-se com evolução de gases perigosos, no ânodo realiza-se a eletrólise d'água, ou oxidação do íon hidroxila, que rende o oxigênio gasoso, conforme exposto abaixo (Fig. 3).



**Fig. 3.** Esquema de eletrólise de membrana para a degradação da sucralose.

A membrana é feita de polivinilpiridina (PVP), que retém o íon cloreto em meio ácido, formando sal. A revitalização da membrana, destarte, far-se-á fora do vaso conforme:



Mantendo a regularidade do processo da eliminação da sucralose, bem como a de confecção e revitalização da membrana, obtém-se um processo ambientalmente amigável da eliminação da sucralose. A depender do pH da solução catódica e do potencial do eletrodo de trabalho, o processo pode ser adaptado a qualquer tipo de compostos cloroorgânicos.

Havendo disso em conta, para descrever o comportamento deste sistema em introduzimos três variáveis:

$s$  – a concentração da sucralose na camada pré-superficial;

$v$  – o grau de recobrimento do vanádio tetravalente na matriz do cátodo;

$h$  – a concentração dos prótons na camada pré-superficial.

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  $\delta$ .

Diante do exposto, o comportamento do sistema será descrito por um conjunto de três equações diferenciais de balanço (6), conforme:

$$\begin{cases} \frac{ds}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (s_0 - s) - r_3 \right) \\ \frac{dv}{dt} = \frac{1}{V} (r_3 - r_4) \\ \frac{dh}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{H}{\delta} (h_0 - h) + r_3 - r_4 \right) \end{cases} \quad (6)$$

Sendo  $s_0$  e  $h_0$  as concentrações da sucralose e dos prótons na camada pré-superficial,  $\Delta$  e  $H$  os seus coeficientes de difusão,  $V$  a concentração superficial máxima do dióxido de vanádio na matriz, formada na superfície do eletrodo,  $r_3$  e  $r_4$  são, por sua vez, as velocidades das reações (3) e (4), expostas como (7 – 8):

$$r_3 = k_3 s (1 - v)^3 \exp(-av) \quad (7)$$

$$r_4 = k_4 v h^2 \exp\left(-\frac{2F\varphi_0}{RT}\right) \quad (8)$$

Sendo os parâmetros  $k$  as constantes das velocidades das respectivas reações,  $a$  é o parâmetro, que descreve a influência da etapa química na estrutura e na capacitância da DCE,  $F=N_A e$  é o número de Faraday,  $\varphi_0$  é o salto do potencial,  $R$  é a constante universal de gases e  $T$  a temperatura absoluta do vaso.

O comportamento do sistema com a eliminação eletrocatalítica da sucralose é bastante dinâmico, haja vista a mudança periódica da estrutura e condutividade da DCE. Entre-



tanto, a estabilidade do estado estacionário no processo é fácil de obter e manter, o que prevê uma eliminação eficiente da sucralose, conforme descrito abaixo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema com a eliminação eletroquímica da sucralose mediante a redução catódica sobre o hidróxido de vanádio, analisamos o CED (6) por meio da teoria de estabilidade lineal. Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi expor-se-ão conforme (9):

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (9),$$

Sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{\Delta}{\delta} - k_3(1-v)^3 \exp(-av) \right) \quad (10)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} (3k_3s(1-v)^2 \exp(-av) - ak_3s(1-v)^3 \exp(-av)) \quad (11)$$

$$a_{13} = 0 \quad (12)$$

$$a_{21} = \frac{1}{v} (k_3(1-v)^3 \exp(-av)) \quad (13)$$

$$a_{22} = \frac{1}{v} \left( -k_3s(1-v)^2 \exp(-av) + ak_3s(1-v)^3 \exp(-av) - k_4h^2 \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) + jk_4vh^2 \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (14)$$

$$a_{23} = \frac{1}{v} \left( -2k_4vh \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (15)$$

$$a_{31} = \frac{2}{\delta} (k_3(1-v)^3 \exp(-av)) \quad (16)$$

$$a_{32} = \frac{2}{\delta} \left( -k_3 s(1-v)^2 \exp(-av) + ak_3 s(1-v)^3 \exp(-av) - k_4 h^2 \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) + jk_4 v h^2 \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (17)$$

$$a_{33} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{H}{\delta} - 2k_4 v h \exp\left(-\frac{2F\phi_0}{RT}\right) \right) \quad (18)$$

Observando os membros da diagonal principal (10), (14) e (18), podemos confirmar a presença dos dois elementos, que podem ter valores positivos. Estes elementos podem ser responsáveis pela positiva conexão de retorno, que, por conseguinte, se manifesta no *comportamento oscilatório* no parâmetro eletroquímico, definido pela bifurcação de Hopf.

Estes elementos são:  $ak_3 s(1-v)^3 \exp(-av)$ , se  $a > 0$  e  $jk_4 v h^2 \exp(-2F\phi_0)/RT > 0$ , se  $j > 0$ , descrevendo a positiva conexão de retorno, que surge durante as reestruturações cíclicas da DCE aquando das etapas química e eletroquímica. Ambos os fatores podem manifestar-se durante os processos semelhantes [16-21]. Outrossim, tanto os cálculos teóricos, como os dados experimentais confirmam que a amplitude e frequência das oscilações são fortemente dependentes da composição do eletrólito de suporte, cujos íons também participam na formação e função da DCE.

Já no caso da negatividade destes elementos é garantida a *estabilidade do estado estacionário*. Para investigá-la, aplicamos ao CED (6) o critério Routh-Hurwitz. Simplificando a análise de determinante da matriz, introduzimos novas variáveis, reexpondo o determinante como:

$$\frac{4}{\delta^2 v} \begin{vmatrix} -\kappa - \varepsilon & \Sigma & 0 \\ \varepsilon & -\Sigma - P & -\Delta \\ \varepsilon & -\Sigma - P & -\eta - \Delta \end{vmatrix} \quad (19)$$

Abrindo os parênteses e aplicando o requisito  $\text{Det } J < 0$ , saliente do critério, obtemos a condição de estabilidade do estado estacionário, exposta conforme (20):

$$-\kappa\eta(\Sigma + P) - \varepsilon\eta(\Sigma + P) + \Sigma\eta\varepsilon < 0 \quad (20),$$

O que pode ser rearranjado para (21):

$$-\kappa\eta\Sigma - \kappa\eta P - P\eta\varepsilon < 0 \quad (21)$$

Descrevendo um sistema controlado pela difusão tanto dos prótons, como da sucralose. A condição (21) é satisfeita de forma garantida, desde que os elementos  $ak_3s(1 - v)^3 \exp(-av)$  e  $jk_4vb^2 \exp(-2F\phi_0)/RT > 0$  tenham valores nulos ou negativos.

Deveras, se supusermos que  $jk_4vb^2 \exp(-2F\phi_0/RT)$  e  $ak_3s(1 - v)^3 \exp(-av)$  tenham valores negativos, o valor geral do lado esquerdo da expressão (21) deslocar-se-á para valores mais negativos. Do ponto de vista de estabilidade isto significará que o valor do expoente, que descreve os desvios dos estados estacionário tenderá a zero, estabilizando o sistema.

A estabilidade do estado estacionário, por sua vez, é definida pela linearidade da dependência entre o parâmetro químico e a concentração da sucralose.

Já o limite entre os estados estacionários estáveis e instáveis é definido pela *instabilidade monotônica*. Matematicamente, ela se define pela condição de  $\text{Det } J = 0$ , ou:

$$-\kappa\eta\Sigma - \kappa\eta P - P\eta\varepsilon < 0 \quad (22)$$

Supondo-se o excesso relativo dos prótons, a concentração dos prótons pode ser considerada constante, e o CED (6), por sua vez, transformar-se-á em (23):

$$\begin{cases} \frac{ds}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (s_0 - s) - r_3 \right) \\ \frac{dv}{dt} = \frac{1}{v} (r_3 - r_4) \end{cases} \quad (23),$$

cuja análise fornecerá os mesmos resultados do ponto de vista do desempenho do processo.

O presente modelo vai sofrer alterações, caso:

- haja duas possibilidades da oxidação de vanádio;
- seja possível a coação de várias formas de vanádio bi- e trivalente;
- exista a possibilidade da dissolução do hidróxido de vanádio em  $V^{2+}$ ;
- seja presente mais um composto cloroorgânico, capaz de participar do processo,

dentre outras situações. Todos os modelos correspondentes serão descritos nos nossos próximos trabalhos.

O hidróxido de vanádio bivalente pode ser depositado facilmente sobre cátodos modificados por:

- polímeros condutores;
- corantes esquáricos;
- materiais de carbono;
- materiais poliméricos inorgânicos.

Assim, o  $V(OH)_2$  fará parte do compósito, em cuja composição desempenhará papel de substância ativa. A matriz, por sua vez, terá função de mediador de transferência. Considerando o compósito na íntegra, pode-se usar o modelo (6) ou o modelo (22).

## CONCLUSÕES

Da análise do processo com a deshalogenização electrocatalítica da sucralose, baseada num processo catódico, assistido pelo hidróxido de vanádio bivalente, é possível concluir que:

- no presente processo, a ação catalítica do hidróxido de vanádio (II) facilita a obtenção e manutenção do estado estacionário estável neste sistema;
- o processo electroquímico é controlado pela difusão tanto da sucralose, como dos prótons;
- o comportamento oscilatório é possível neste sistema. Ele é causado pelos efeitos periódicos na estrutura da dupla camada eléctrica;
- a amplitude e a frequência das oscilações serão dependentes da composição do electrólito de suporte.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

## REFERÊNCIAS

1. FDA, Aspartame and Other Sweeteners in Food. URL: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/aspartame-and-other-sweeteners-food>, acesso aos 29 de março de 2017.
2. S. Schiffman, K.I. Rother, Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: Overview of biological issues, *J. Toxicol. Environm. Health B, Crit. Rev.*, **16**, 399-451 (2013).
3. Sucralose. URL: <http://foodconstrued.com/2015/07/sucralose>, acesso aos 29 de março de 2017.
4. Dr. Edward Group III, *Health begins in the colon*, GC Health, Houston, Texas, 2007.
5. J.C. Bórquez, M. Hidalgo, J.M. Rodríguez, *et al.*, Sucralose stimulates mitochondrial bioenergetics in Caco-2 Cells, *Front. Nutr.*, **7**, 361 (2021).
6. M.B. Abou-Donia, E.M. El-Masry, A.A. Abdel-Rahman *et al.*, Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats, *J. Toxicol. Environm. Health A*, **71**, 1415-1429 (2008).
7. L. Hou, X. Zhang, D. Wang, A. Baccarelli, Environmental chemical exposures and human epigenetics, *Int. J. Epidemiol.*, **41**, 79-105 (2012).
8. J.A. Aguayo-Guerrero, L.A. Méndez-García, A.N. Manjarrez-Reyna, *et al.*, Newborns from mothers who intensively consumed sucralose during pregnancy are heavier and exhibit markers of metabolic alteration and low-grade systemic inflammation: A cross-sectional prospective study, *Biomedicines*, **11**, 650 (2023).
9. A. Rahn, V.A. Yaylayan, Thermal degradation of sucralose and its potential in generating chloropropanols in the presence of glycerol, *Food Chem.*, **118**, 56-61 (2010).
10. Y. Yang, Z. Liu, Z. H. Zheng, *et al.*, Sucralose, a persistent artificial sweetener in the urban water cycle: insights into occurrence, chlorinated byproducts formation, and human exposure, *J. Environ. Chem. Eng.*, **9**, 105293 (2021).
11. W. Yan, N. Wang, P. Zhang *et al.*, Simultaneous determination of sucralose and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *Food Chem.*, **204**, 358 (2016).

12. E. Wong, K. Lui, A.S. Day, S.T. Leach, Manipulating the neonatal gut microbiome: Current understanding and future perspectives, *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.*, **107**(4), 346-350 (2022).
13. Sh. Li, J. Geng, G. Wu, *et al.*, Removal of artificial sweeteners and their effects on microbial communities in sequencing batch reactors, *Sci. Rep.*, **8**, 3399 (2018).
14. V. Ivanov, V. Stabnikov, J.H. Tay, Removal of the recalcitrant artificial sweetener sucralose and its by-products from industrial wastewater using microbial reduction/oxidation of iron, *ChemEngineering*, **2**(3), 33 (2018).
15. E. Escobedo, J. Kim, D. Oh *et al.*, Electrocatalytic dehalogenation of aqueous pollutants by dealloyed nanoporous Pd/Ti cathode, *Catal. Today*, **361**, 63-68 (2021).
16. D.G. Peters, C.M. McGuire, E.M. Pasciak, *et al.*, Electrochemical dehalogenation of organic pollutants, *J. Mex. Chem. Soc.*, **58**, 287-302 (2014).
17. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47A**, 1798-1803 (2008).
18. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene), *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 280-285 (2004).
19. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys electrodes in acidic and neutral organic media, *Synthetic Metals*, **130**, 73-83 (2002).
20. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, N.M. Storoshchuk, *et al.*, Sucralose CoO(OH)-assisted electrochemical detection in alkaline media. The theoretical analysis of an interesting possibility, *Appl. J. Env. Eng. Sci.*, **8**, 215-222 (2022).
21. V.V. Tkach, N.M. Storoshchuk, B.D. Storoshchuk, *et al.*, The theoretical description for sucralose cathodic electrochemical determination over a poly(safranin)-modified electrode, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **13**, 520 (2023).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, N.M. Storoshchuk, S.C. de Oliveira, O.V. Luganska, V.V. Kopyika, N.V. Novosad, S.M. Lukanova, Y.G. Ivanushko, V.G. Ostapchuk, S.P. Melnychuk, P.I. Yagodynets', J.I.F. de Paiva-Martins, L. Vaz dos Reis, O uso do hidróxido de vanádio bivalente para a eliminação da sucralose das águas naturais e de esgoto da indústria alimentar e farmacêutica. Uma avaliação teórica, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 955-968 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110749>

# Elaboración de un bioadsorbente modificado a partir de los desechos de camarón para la descontaminación de aguas residuales

Cesar Augusto Londoño Giraldo<sup>1\*</sup>, Kelly Barrera Enriquez<sup>1</sup>,  
John Jairo Rojas Camargo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Remediación Ambiental y Biocatálisis (GIRAB), Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia (UdeA), Cl. 70 #52-21, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines (DYFOMECO), Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia (UdeA), Cl. 70 #52-21, Medellín, Colombia.

\*Autor de correspondencia: cesarlondonoqf@gmail.com

Recibido: 19 de abril de 2023

Revisado: 5 de junio de 2023

Aceptado: 8 de junio de 2023

## RESUMEN

**Objetivo:** desarrollar un bioadsorbente modificado químicamente a partir de los desechos de camarón para la remoción de fármacos de aguas residuales. **Métodos:** se elaboraron bioadsorbentes mediante pirolisis y activación química con ácido fosfórico, urea y ferromagnetita, usando como precursor exoesqueleto de camarón. Los bioadsorbentes producidos se caracterizaron por espectrofotometría FT-IR, volumen real, área superficial, punto de carga zero (PZC), y titulaciones Boehm. También se retaron según su capacidad adsorbente respecto a ocho de los fármacos más consumidos en Colombia. La interrelación de estas variables se estudió por análisis multivariado. **Resultados:** el carbonizado (CAR) contenía prevalencia de elementos tipo carbono y oxígeno producto de la pirolisis intensificando las bandas de C-O-C, CH<sub>2</sub> y algunos grupos fenólicos. La superficie de los materiales activados con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (CA1:3A y CA1:3B) contenía grupos ácidos como P=O, P-O-C y P=OOH, pero estos no aumentaron significativamente el volumen real y el área superficial específica (11,4 m<sup>2</sup>/g) al compararse con EE (10,3 m<sup>2</sup>/g). En el CA1:3U prevalecieron grupos fenólicos, y básicos como C-O y C-N, mientras el CAM poseía grupos Fe-O y FeOH. Así, el CAM y CA1:3U mostraron un alto porcentaje de remoción, especialmente para el verapamilo (~100%), amlodipino (>45%) y ampicilina (>45%). En cambio, la remoción de metformina fue ineficiente con la mayoría



de adsorbentes (<40%). **Conclusión:** estos bioadsorbentes se presentan como una alternativa para la reducción de aguas contaminadas por fármacos, especialmente por verapamilo y amlodipino, y ayudan a mitigar el impacto ambiental ocasionado por los residuos de camarón.

**Palabras clave:** Desechos de camarón, remoción de fármacos contaminantes, bioadsorbentes.

## SUMMARY

### Preparation of a modified bioadsorbent from shrimp waste for the decontamination of wastewater

**Aim:** To develop a chemically modified bioadsorbent from shrimp waste for the removal of drugs from wastewater. **Methods:** Bioadsorbents were made by pyrolysis and chemical activation with phosphoric acid, urea, and ferromagnetite, using shrimp waste as a precursor. **Results:** The bioadsorbents were characterized by FT-IR spectrophotometry, true volume, surface area, Zero Point Charge (PZC), and Boehm titrations. They were also challenged based on their adsorbent capacity with respect to eight of the most widely consumed drugs in Colombia. The interrelation of these variables was studied by multivariate analysis. The biochar (CAR) contained a prevalence of elements such as carbon and oxygen, product of pyrolysis, intensifying the bands of C-O-C, CH<sub>2</sub> and some phenolic groups. The surface of the materials activated with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (CA1:3A and CA1:3B) contained acid groups such as P=O, P-O-C, and P=OOH, but these did not significantly increase the actual volume and specific surface area (11.4 m<sup>2</sup>/g) when compared to EE (10.3 m<sup>2</sup>/g). In CA1:3U, phenolic groups prevailed and basic ones such as C-O and C-N, while CAM had Fe-O and FeOH groups. Thus, CAM and CA1:3U showed a high clearance rate, especially for verapamil (~100%), amlodipine (>45%), and ampicillin (>45%). In contrast, metformin removal was inefficient with most adsorbents (<40%). **Conclusion:** These biosorbents are presented as an alternative to reduce water contaminated by drugs, especially verapamil and amlodipine, and help mitigate the environmental impact caused by shrimp waste.

**Keywords:** Shrimp waste, removal of contaminating drugs, bioadsorbents.

## RESUMO

### Preparação de um bioadsorbente modificado a partir de resíduos de camarão para a descontaminação de águas residuais

**Objetivo:** desenvolver um bioadsorbente quimicamente modificado a partir de resíduos de camarão para a remoção de drogas de águas residuais. **Métodos:** os biossorbentes foram preparados por pirólise e ativação química com ácido fosfórico, uréia e ferromagnetita, utilizando exoesqueleto de camarão como precursor. Os biossorbentes produzidos foram caracterizados por espectrofotometria FT-IR, volume real, área superficial, carga de ponto zero (PZC) e titulações de Boehm. Eles também foram desafiados com base em sua capacidade adsorvente em relação a oito das drogas mais consumidas na Colômbia. A inter-relação dessas variáveis foi estudada por análise multivariada. **Resultados:** o char (CAR) continha predominância de elementos como carbono e oxigênio, produto da pirólise, intensificando as bandas de C-O-C, CH<sub>2</sub> e alguns grupos fenólicos. A superfície dos materiais ativados com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (CA1:3A e CA1:3B) continha grupos ácidos como P=O, P-O-C e P=OOH, mas estes não aumentaram significativamente o volume real e a área superficial específica (11,4 m<sup>2</sup>/g) quando comparado com EE (10,3 m<sup>2</sup>/g). Em CA1:3U, predominaram grupos fenólicos e básicos como C-O e C-N, enquanto CAM apresentou grupos Fe-O e FeOH. Assim, CAM e CA1:3U apresentaram alta taxa de depuração, especialmente para verapamil (~100%), anlodipino (>45%) e ampicilina (>45%). Em contraste, a remoção da metformina foi ineficiente com a maioria dos adsorbentes (<40%). **Conclusão:** esses biossorbentes apresentam-se como uma alternativa para reduzir a água contaminada por medicamentos, principalmente verapamil e anlodipino, e ajudam a mitigar o impacto ambiental causado pelos dejetos do camarão.

**Palavras-chave:** Resíduos de camarão, remoção de drogas contaminantes, bioadsorbentes.

## INTRODUCCIÓN

El agua es el compuesto más importante para la vida en la tierra; no obstante, menos del 1% de esta es potable, y esta cifra se ha reducido drásticamente por la presencia de varios contaminantes considerados emergentes. Entre ellos se encuentran los fármacos y sus metabolitos, que ingresan continuamente a las aguas residuales y al ambiente acuático por las descargas de la industria farmacéutica, hospitales, y aguas

residuales urbanas [1]. Esto significa que estos contaminantes se encuentran presentes en aguas residuales, subterráneas y parcialmente tratadas a concentraciones de  $\sim 0,1 \mu\text{g/L}$ , mientras que en las aguas tratadas se han encontrado valores inferiores a  $0,05 \mu\text{g/L}$  [2]. La presencia de estos fármacos, aún en escala de  $0,1 \mu\text{g/mL}$  puede afectar la salud humana, la vida acuática y el medio ambiente. Por ejemplo, algunos antihipertensivos como el amlodipino y sus fotoproductos generan un efecto tóxico potencial sobre organismos de agua dulce como la *Ceriodaphnia dubia* [3]. Mientras que el losartan genera serios efectos ecotoxicológicos según los estudios de inhibición de especies de plantas acuáticas como la lenteja de agua menor (*Lemma minor*) [4]. Por otro lado, el verapamilo, propanolol, enalapril, ranitidina y metformina presentes en el agua y el cuerpo de algunos peces como el salmón y el sculpin afectan el normal funcionamiento fisiológico de este tipo de peces de agua dulce. Similarmente, la presencia de antibióticos como la ampicilina en los cuerpos del ecosistema acuático puede generar efectos tóxicos y la proliferación de resistencia bacteriana [5].

Considerando que los métodos tradicionales empleados en las plantas de tratamiento de aguas son ineficientes para remover fármacos, es necesario desarrollar nuevos métodos más eficientes y menos costosos. El proceso de adsorción ha sido estudiado como una alternativa promisoriosa y sostenible al emplear como bioadsorbentes los desechos y subproductos de la agricultura y otras industrias que resultan de bajo costo debido a su abundancia en la naturaleza y menor requerimiento de procesamiento. Se han utilizado como adsorbentes los desechos sólidos agrícolas en su forma natural o después de alguna modificación física o química tales como cascarilla de arroz, desechos de café, desechos de maíz, entre otros. Una gran cantidad de adsorbentes han sido usados para la eliminación de fármacos en aguas residuales (Tabla 1). Por ejemplo, el biocarbono obtenido con NaOH al 5% ha removido diferentes tipos de antibióticos como amoxicilina, cefalexina, tetraciclina y penicilina G con un porcentaje de adsorción de 55,6%, 76,0% 88,3% y 73,9%, respectivamente [6]. También, se ha logrado eliminar acetaminofén usando biocarbono obtenido a partir de cascarilla de arroz y café [7]. Otros estudios mencionan el uso de biocarbons para la remoción de metoprolol, ranitidina y cafeína. En este caso, para ranitidina y cafeína alcanzaron una eficiencia del 99% [8]. En otro estudio se empleó un biocarbono activado con peroxidisulfato para la eliminación de sulfametoxazol [9] y paracetamol [10]. Igualmente, los biocarbons funcionalizados con  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se han usado para adsorber tetraciclina y carbamazepina, con eficiencias del 97 y 98,4%, respectivamente [11].

**Tabla 1.** Bioadsorbentes empleados para la eliminación de fármacos en aguas residuales

Bioadsorbente	Fármaco removido	Referencia
• Hojas de té	Ciprofloxacina	[12]
• Hueso bovino	Cafeína	[12]
• Fibra de palma aceitera	Acetaminofén	[12]
• Pseudotallo de banana	Amoxicilina	[12]
• Cascara de frijol mungo	Ranitidina clorhidrato	[13]
• Biocarbono de Cascarilla de arroz		[14]
• Arcilla organofílica	Losartan potásico	[15]
• Carbón tratado nitrógeno líquido	Ampicilina sódica	[16]
• Poliamida/zirconium iodato		[17]
• Bentonita		[18]
• Caolín de arcillas iraquíes y atapulgita	Enalapril maleato	[19]
• Almidón de maíz y celulosa microcristalina	Amlodipino besilato	[20]
• Nanopartículas de carbono		[21]
• Carbones activados con ácido fosfórico de Jacinto	Metformina clorhidrato	[22]
• Arcillas activadas con HCl		[23]
• Carburo de titanio	Verapamilo clorhidrato	[24]
• Compuestos magnéticos de atapulgita/óxido de grafeno	Propranolol clorhidrato	[25]
• Arcilla de bentonita tratada térmicamente		[26]

Entre las alternativas prometedoras como desechos bioadsorbentes se encuentran los provenientes de la industria pesquera y alimenticia. En el 2021 la producción mundial de estos crustáceos se mantuvo en cerca de 5,4 millones de toneladas. En Colombia, según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la producción de camarones se ha mantenido alrededor de 5000 toneladas anuales. Teniendo en cuenta que cerca del 50% del peso del camarón corresponde al exoesqueleto que posteriormente es desechado, se plantea la necesidad de buscar alternativas para su adecuada disposición y aprovechamiento, ya que contienen una importante cantidad de compuestos de interés farmacéutico, alimenticio y para la descontaminación de aguas [27].

Los exoesqueletos de camarón están compuestos por quitina (56,1%), seguido de proteínas (26%), lípidos (5,2%) y minerales (12,7%) [28]. La quitina es la más relevante, ya que es considerada como el segundo polisacárido natural más importante en el mundo después de la celulosa, y que contiene grupos funcionales como la acetamida,

que puede jugar un papel importante en la adsorción de contaminantes por medio de interacciones electrostáticas [25].

Se encuentran estudios que han producido carbón activado (CA) de exoesqueletos activado con ácido fosfórico que indican ser útiles para adsorber azul de metileno a  $\text{pH} > 8$  [29] y potencialmente cristal violeta [30].

Aunque se ha reportado la remoción de fármacos con biocarbons obtenidos de residuos vegetales, no existen estudios sobre producción de bioadsorbentes de desechos de camarón modificados químicamente para la eliminación de grandes grupos de fármacos contaminantes representativos por su gran uso en el país como antimicrobianos (ampicilina), antihipertensivos (amlodipino, losartan, y enalapril), antiarrítmicos (verapamilo y propanolol), antidiabéticos (metformina) y antiácidos (ranitidina). Por otra parte, los heteroátomos de los desechos de camarón (ejem. N, O, P) son básicos y nucleófilos pueden ser prometedores para la remoción de estos fármacos representativos.

Debido a la necesidad de hallar nuevos métodos de adsorción de fármacos, se necesitan materiales de fácil acceso y de mayor capacidad de adsorción en comparación con los materiales convencionales. Por esta razón, los desechos de camarón modificados pueden ser una buena alternativa gracias a alta disponibilidad, bajo costo de producción y a sus procesos amigables con el medio ambiente implementando técnicas de bajo consumo de sustancias químicas.

## METODOLOGÍA

### Materiales y reactivos

Como material adsorbente de referencia se utilizó un carbón activado comercial (CAC) de origen mineral (Bell Chem Internacional S.A, Rionegro, Colombia). Por otra parte, el hipoclorito de sodio empleado en los lavados de los exoesqueletos de camarón de partida (EE) fue obtenido de Químicos LM (Medellín, Colombia). Para la activación de los bioadsorbentes se empleó ácido fosfórico al 85% (Merck, Darmstadt, Alemania) y para la fabricación del material CAM se utilizó magnetita marca Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU. Se utilizó urea (Supelco, San Luis, Misuri, EE. UU) para la activación del carbonizado e hidróxido de potasio (Merck, Darmstadt, Alemania) para los lavados finales del material. Los principios activos Ampicilina sódica, amlodipino besilato, enalapril maleato, losartan potásico, metformina clorhidrato, propanolol clorhidrato, ranitidina clorhidrato y verapamilo clorhidrato fueron donados por el Laboratorio Laproff S.A., Sabaneta, Antioquia.

### **Obtención de Exoesqueletos de Camarón Puro (EE)**

Los exoesqueletos de camarón (~500 g) se obtuvieron frescos, fueron secados al sol con NaCl y transportados bajo cadena de frío a -5°C. Se molieron con un molino de cuchillas (Willey Arthur Thomas Co, Filadelfia, Estados Unidos) hasta obtener un tamaño de partícula <150 µm y se trataron con hipoclorito de sodio al 15% por 5 días para neutralizar el olor del material. Luego, se lavó, se neutralizó con HCl 1,0 M y se filtró al vacío. El material se pasó por malla 200 (75 µm), se sometió a lavados sucesivos con agua destilada y se sonicó a 40 °C por 30 minutos con agitación constante (ELMA, Ref. Elmasonic E 15H, Alemania). Este proceso se realizó hasta obtener un valor constante de conductividad y pH (Radiometer Copenhagen, Ref. PHM 93 pH meter, Francia) para eliminar posibles impurezas del material (Tabla 2). Finalmente, los exoesqueletos se secaron a 100 °C por 24 h en una estufa de bandejas (modelo U30 Memmert, Schwabach, Alemania) y el polvo se pasó por malla 200 (75 µm) para eliminar aglomerados. Este material fue denominado EE.

Se realizó un barrido UV/VIS de los EE para determinar la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en medio acuoso. Para esto se pesó 20 mg de cada adsorbente, se dispersó en 20 mL de agua destilada y luego se agitó magnéticamente durante 20 min a 100 rpm. En un espectrofotómetro (Mettler Toledo, modelo UV5, Greifensee, Zúrich, Suiza) se realizaron 3 mediciones por cada adsorbente tomando alícuotas previamente filtradas por un tamaño de poro de 0,22 µm. Se tomó un rango de longitud de onda entre 200 nm y 800 nm.

### **Producción de exoesqueletos carbonizados (CAR)**

La carbonización de los exoesqueletos se realizó en una mufla (KSY-6D-16B, Electric Furnace Factory, Francia) conectada a una fuente de nitrógeno (N<sub>2</sub>) al 99,995% de pureza (Cryogas, Medellín, Colombia) a través de un tubo de cuarzo ubicado en la parte posterior de la mufla. Se programó un gradiente de calentamiento de 5.0 °C/min hasta alcanzar los 500 °C. El proceso de carbonización se realizó por 2 h bajo un flujo constante de N<sub>2</sub> a 240 mL/min para la formación de una atmósfera inerte. Posteriormente, se apagó la mufla para enfriar el sistema manteniendo el flujo constante de N<sub>2</sub> para evitar la oxidación de la muestra. Finalmente, el material carbonizado se pasó por malla 200 (75 µm) y fue denominado CAR.

### **Producción de bioadsorbentes activados con ácido fosfórico (CA1:3A – CA1:3B)**

En esta metodología se utilizó ácido fosfórico como activador, el cual actúa como agente oxidante y/o deshidratante de la estructura macromolecular carbonosa y penetra en el interior estructural del precursor causando su hinchamiento, generando un material poroso con capacidad adsorbente.

Para la producción del bioadsorbente CA1:3A se empleó una proporción precursor/activador de 1:3. Inicialmente, en un crisol se impregnaron 6 g de EE con 9,6 mL de  $H_3PO_4$  al 85% (considerando su densidad de 1,88 g/mL). Esta mezcla inicial se realizó bajo agitación constante con ayuda de una varilla de vidrio con agitación constante. Posteriormente, el material se introdujo en la mufla para su activación química y se realizó el mismo proceso de calcinación descrito para el material CAR. Luego de obtener el material se neutralizó con KOH 0,1 N para eliminar la presencia de  $H_3PO_4$  residual hasta obtener un pH de  $\sim 7,0$ . El material resultante se lavó con agua caliente, se filtró al vacío, se secó en una estufa a 100 °C por 48 h y se pasó por malla 200 (75  $\mu m$ ). Para la producción del material CA1:3B se realizó el mismo proceso descrito para la elaboración del CA1:3A, la única diferencia radica en que el CAR fue el material de partida.

### **Producción de carbonizado activado con magnetita (CAM)**

Esta modificación se realizó en un equipo de ultrasonido con una potencia máxima de salida de 750 watts, equipado con un sonotrodo de titanio incorporado en una celda para homogenización Rosett y operado a una amplitud del 40% mediante 5 ciclos de 4 minutos cada uno para evitar el sobrecalentamiento del equipo (modelo Vibra Cell, marca Sonics, Church Hill Rd., Newtown, Connecticut, EE. UU.). Se empleó el método de Nadezhda A. Samoilova y colaboradores para la preparación de un compuesto magnético de quitina con algunas modificaciones [31]. Inicialmente, se mezclaron 5 g de magnetita con 500 mL de agua desionizada y luego se adicionó una suspensión de 10 g de CAR dispersos en 50 mL de  $CH_3COOH$  al 1%. Posteriormente, el sonotrodo fue inmerso en la suspensión y se inició el tratamiento ultrasónico bajo una frecuencia de 24 kHz. Después del proceso, la suspensión resultante se filtró al vacío y se secó en una estufa a una temperatura de 100 °C por 24 h, este material resultante se calcinó mediante el mismo proceso descrito previamente para el material CAR. Este bioadsorbente se denominó CAM.

### **Producción de bioadsorbentes activados con urea (EEU – CA1:3U)**

Se utilizó el método reportado por Qiao Liu con algunas modificaciones [32]. Para la elaboración del bioadsorbente EEU se empleó una proporción precursor/activador de 1:3. Así, en un crisol y se mezclaron 5 g de EE con 15 g de urea en 50 mL de una solución de  $CH_3COOH$  al 5%. Esta mezcla inicial se realizó bajo agitación constante con ayuda de una varilla de vidrio. Posteriormente, el material se introdujo en la mufla para su activación química y se realizó el mismo proceso de pirólisis descrito previamente para el material CAR. Luego de obtener el material se neutralizó con KOH 0,1 N para eliminar el exceso de urea hasta obtener un pH de  $\sim 9,4$ . El material resultante se lavó con agua caliente, se filtró al vacío, se secó en una estufa a 100 °C por 48 h y se pasó por malla 200 (75  $\mu m$ ). En la producción del material CA1:3U se realizó el mismo proceso

descrito previamente para la producción del bioadsorbente EEU, partiendo del bioadsorbente denominado CAR como precursor.

### Caracterización fisicoquímica de los bioadsorbentes

#### *Caracterización por Espectroscopia Infrarroja por Transformadas de Fourier (FT-IR)*

Este análisis se realizó en un espectrofotómetro FT-IR (modelo Nicolet, marca Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) mediante la técnica ATR (Reflexión Total Atenuada) con lecturas en un rango entre 2000 y 600  $\text{cm}^{-1}$  y 16 barridos a una resolución de 400  $\text{cm}^{-1}$ . Esta técnica permite analizar directamente el material sin un tratamiento previo mediante la medición de los cambios que ocurren en un haz infrarrojo reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con la muestra en análisis. En este caso, un haz infrarrojo se dirige hacia un cristal denso con alto índice de refracción, esta reflectancia crea una onda evanescente que se extiende hacia la muestra en contacto con el cristal. Cuando la muestra absorbe energía, el haz se atenúa y se dirige al detector el cual registra la señal generando un espectro infrarrojo.

#### *Volumen real*

Se empleó un picnómetro de Helio (Micromeritics, referencia AccuPyC II 1340, Norcross, EE.UU.) y se introdujo una cantidad conocida de material adsorbente pesado en la balanza analítica (Mettler Toledo, modelo H80, Zúrich, Suiza).

#### *Área Superficial Específica (BET)*

Se empleó el método BET usando nitrógeno como adsorbato en un sortómetro (modelo 1200e Quantachrome, Boynton Beach, EE. UU.). Las muestras fueron sometidas durante 4 h a 250 °C, excepto EE, que se sometió a 150 °C bajo condiciones de vacío (15 mmHg). Para calcular el área superficial mediante la isoterma BET se empleó  $P/P_0$  de 0,05 a 0,25 usando la Ecuación 1:

$$X \left[ \frac{P_0}{P} - 1 \right] = \frac{C-1}{X_m C} \left( \frac{P}{P_0} \right) + \frac{1}{X_m C} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde,  $P$  es la presión parcial del absorbido,  $P_0$  corresponde a la presión de vapor saturado,  $X$  es la masa del contaminante absorbido,  $X_m$  es la masa del contaminante absorbido en la monocapa y  $C$  está relacionado con la constante del calor de adsorción. El área superficial se calculó aplicando la Ecuación 2:

$$S = \frac{X_m \cdot N_A \cdot A}{M \cdot w} \quad (\text{Ec. 2})$$



Donde,  $S$  pertenece al área superficial específica,  $A$  es el área de la molécula de nitrógeno ( $16,2 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ ),  $N_A$  corresponde al número de Avogadro,  $M$  corresponde de 28,0 g/mol y  $w$  es el peso del material.

### Determinación de grupos funcionales por metodología Boehm

Se pesaron 0,1 g de cada adsorbente y se adicionó 25 mL de las siguientes soluciones según el tipo de grupo funcional a evaluar. Para determinar grupos ácidos se agregó NaOH 0,1 M;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,05 M y  $\text{NaHCO}_3$  0,05 M. Para hallar los grupos básicos se empleó una solución de HCl 0,1 M. Luego, las soluciones se agitaron por 24 h, se tomaron alícuotas de 5 mL y se filtraron empleando un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, se tituló el NaOH y los carbonatos con HCl 0,1M con fenolftaleína y verde de bromocresol como indicadores, respectivamente. El HCl 0,1M se tituló con NaOH 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. La magnitud de los grupos funcionales se cuantificó mediante cálculos estequiométricos, teniendo en cuenta que para los ácidos el NaOH neutraliza los grupos carboxílicos, lactónicos y fenólicos; mientras que el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutraliza a los grupos carboxílicos y lactónicos. Por otra parte, el  $\text{NaHCO}_3$  solo neutraliza los grupos carboxílicos. El carácter básico superficial se cuantificó según la cantidad de HCl que neutralizó los grupos funcionales básicos de cada adsorbente.

### Determinación del Punto de Carga Cero (PZC)

Se pesaron por separado 10,0 mg de cada adsorbente en 10 mL de diferentes soluciones acuosas con los siguientes valores de pH (2, 4,3, 6,6, 8,2, 10,3, 12,0). Las lecturas se realizaron en un medidor de potencial zeta (ZetaSizer, Nano-ZS90 nano Series, Malvern Instruments Ltd., UK,) mediante el *software* ZetaSizer, Versión 7.10. Las cuantificaciones se hicieron por triplicado a 25 °C con un tiempo de equilibrio de 2 min. Finalmente, el potencial cero se calculó al graficar el pH de cada muestra versus los mV obtenidos de acuerdo con el principio de velocimetría de láser Doppler.

### Ensayos de adsorción

Para cada fármaco se realizó una curva de calibración a partir de una solución stock de 200 ppm formada por concentraciones sucesivas de 1,6, 4,1, 8,2, 16,4, 25, 35 y 45 ppm. La absorbancia de cada fármaco fue cuantificada por cuadruplicado según la longitud de onda de su pico máximo en un espectrofotómetro UV/Vis por arreglo de Diodos (Mettler Toledo, modelo UV5, Greifensee, Zúrich, Suiza).

Para cuantificar la capacidad de remoción se tomó cada uno de los materiales (7 en total) y se evaluó frente a los 8 fármacos estudiados. Para esto, se tomaron por cua-

druplicado 20 mg de cada adsorbente en 25 mL de una solución de 12,5 ppm de cada fármaco disuelto en agua destilada. El proceso se llevó a cabo mediante agitación magnética por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra se dejó en reposo por 30 min para facilitar su decantación y luego se filtró empleando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  previo a su lectura en el espectrofotómetro UV/Vis. Adicionalmente, se realizaron controles negativos de 20 mg del adsorbente en 25 mL de agua destilada para determinar la absorbancia de los materiales a cada longitud de onda máxima y evitar falsos positivos. La capacidad de remoción para cada material se calculó empleando la ecuación 3:

$$\% \text{Adsorción} = \frac{C_0 - (C_e - C_b)}{C_0} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde,  $C_0$  es la absorbancia de la concentración inicial del contaminante a una concentración de 12,5 ppm,  $C_e$  es la absorbancia del promedio de las cuatro lecturas de cada muestra después del proceso de agitación y decantación y  $C_b$  es la absorbancia del promedio de las cuatro lecturas de su respectivo control negativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Recolección y tratamiento inicial de residuos de camarón

Al realizar los lavados de los exoesqueletos de camarón tratos se hicieron lavados con agua hasta obtener un pH de  $\sim 8,86$  y una conductividad cerca al agua de acueducto (Tabla 2). El tratamiento con hipoclorito por ser un agente un oxidante pretendía reducir los compuestos volátiles por medio de reacciones redox para eliminar los compuestos que pudieran producir interferencias posteriores. El producto resultante fue de color amarillo y olor ligeramente aminado.

**Tabla 2.** Valores de pH y conductividad de las suspensiones acuosas de los bioadsorbentes

Suspensión	Sin Filtrar		Filtrado	
	$\mu\text{S}/\text{cm}$	pH	$\mu\text{S}/\text{cm}$	pH
EE	217	8,86	271	9,10
CAM	129	8,84	74	8,70
CAC	548	6,42	3268	6,95
CAU	504	9,36	167	9,06
Amlodipino Besilato	340	5,14	N.A.	N.A.
Verapamilo Clorhidrato	212	5,31	N.A.	N.A.

El espectro FT-IR de este material se muestra en la Figura 1. El desecho de camarón sin ninguna modificación química (EE) muestra dos bandas a  $1191\text{ cm}^{-1}$  y  $895\text{ cm}^{-1}$ , ambas son comunes para la quitina que posee un pequeño grado de desacetilación y corresponden al enlace  $\beta$  1-4. Las bandas observadas a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1557\text{ cm}^{-1}$  corresponden al grupo acetamida de la amida tipo I y la torsión NH tipo II. Igualmente, las bandas a  $1329$  y  $1377\text{ cm}^{-1}$  son típicas de la amida tipo III y las vibraciones del estiramiento del grupo metilo de los grupos acetamida. El pico a  $1427\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la torsión simétrica del  $\text{CH}_2$ , el pico a  $1255\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la torsión de C-O-H y el pico a  $1161\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento simétrico C-O-C (por el enlace  $\beta$ -glucosídico). El pico a  $1063\text{ cm}^{-1}$  es debido al estiramiento C-O/C-C y la señal a  $895\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento fuera del plano asimétrico del carbono  $\beta$ -glucosídico. Es de mencionar que las señales anteriormente vistas corresponden a la estructura principal de quitina y no existe evidencia que demuestre que haya restos proteicos del material.

### Modificaciones químicas de los desechos de camarón

#### *Producción de material carbonizado (CAR)*

Al someter el EE a un proceso de carbonización se eliminan elementos como el oxígeno y el nitrógeno por descomposición pirolítica en atmósfera inerte resultando en deshidratación del material y eliminación de sustancias volátiles. La ventaja del proceso de carbonización es que al ser un proceso de pirolisis de un ciclo se reduce el tiempo de operación, el consumo energético, y el costo. En este estudio el tratamiento de carbonización a  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h bajo una atmósfera de flujo de nitrógeno constante produjo cambios drásticos en la estructura del EE. Así, se obtuvo un producto con prevalencia de grupos funcionales con un esqueleto carbonoso. Se sabe que las bandas de estiramiento vibracionales a  $1740$  y  $1026\text{ cm}^{-1}$  se asocian con la estructura C-O-C de la quitina y para este producto se incrementó esta señal mucho más con respecto al EE de partida.

También se observa que muchos grupos funcionales de la superficie cambiaron específicamente de las acetamidas, las cuales desaparecieron casi por completo posiblemente debido a la producción de dióxido de nitrógeno volátil. Al tomar de referencia la banda a  $1050\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a C-O-C y la intensidad relativa de las otras bandas con respecto a este, se observa una fuerte reducción (50%) de la banda inicial del carbonilo ( $\sim 1650$  y  $1657\text{ cm}^{-1}$ ) y aumento del 70% y 120% de las bandas de  $\text{CH}_2$  ( $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ ) y C-O-C ( $895\text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente. Esto se refleja en una fuerte formación de una estructura carbonosa. También, en el CAR, las vibraciones en el rango de  $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con el estiramiento C-O en grupos ácidos,

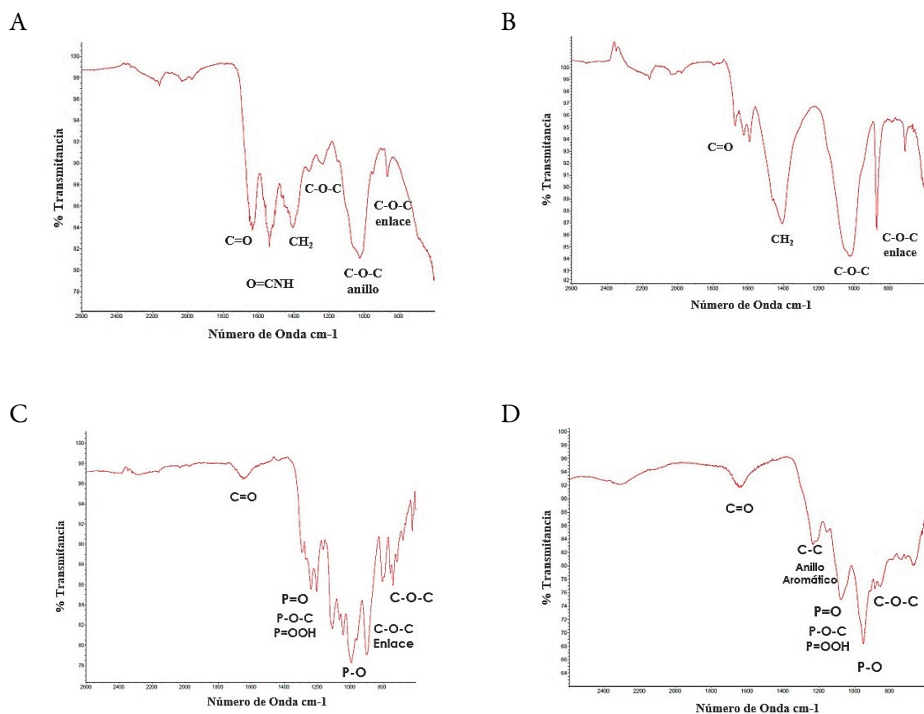
alcoholes, fenoles, éteres y/o ésteres. Estos carbonizados muestran grupos funcionales muy similares a los obtenidos por otras fuentes naturales vegetales como los carbonizados de la caña de azúcar [33].

Se ha reportado que en el biocarbono la basicidad está asociada a la presencia de carbonilos, cromolina, pirona y estructuras tipo Lewis libres de oxígeno, mientras que el comportamiento ácido está relacionado con grupos anhídridos, y fenoles [34].

### **Producción de biocarbonos activados con ácido fosfórico**

El proceso de carbonización del exoesqueleto se realizó en presencia de ácido fosfórico (CA1:3A), y también tratando el EE con el mismo ácido y sometido a carbonización (CA1:3B). Debido al carácter altamente polar del ácido fosfórico, este interactúa física y químicamente con el sustrato durante el tratamiento de activación. La proporción de material y ácido fosfórico se mantuvo de 1:3 debido a estudios previos realizados donde se determinó que esta proporción era la que generaba mayor porcentaje de adsorción para colorantes industriales tipo cristal violeta [30]. Este tratamiento ácido tiene la ventaja de eliminar alquitranes y desbloquear poros en una sola etapa. Durante la activación con  $H_3PO_4$  también se produce una oxidación lenta del carbón formando poros sobre su superficie [30]. La activación con  $H_3PO_4$  se produce por deshidratación y descomposición del bioadsorbente e incorpora grupos funcionales ácidos dentro de la estructura de las partículas como fosfatos y ésteres de polifosfatos. Esta activación permitió obtener una estructura porosa con características ácidas confirmadas con el valor PZC (Tabla 3), pero no generó un aumento significativo del volumen real del material, ni del área superficial específica ( $11,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ) al compararse con el EE ( $10,3 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

La disminución del área superficial de CA1:3B con relación al CAR puede deberse al proceso de doble pirólisis por un total de 4 h teniendo una influencia destructiva en la porosidad del adsorbente, tal vez debido a la interconexión de los poros finos y la conversión de ellos en grandes macroporos [35]. El CA1:3A y CA1:3B muestra la presencia de grupos  $C=O$  típicos de cetonas, produciendo pequeños picos alrededor de  $1700 \text{ cm}^{-1}$ . Las vibraciones entre  $1582$  y  $1570 \text{ cm}^{-1}$  también se atribuyen a las vibraciones  $C=C$  de los anillos aromáticos [36]. La doble carbonización disminuyó la macroestructura del exoesqueleto de carbono  $C-O-C$  ya que esta señal se observó un poco más disminuida debido a que el precursor del material CA1:3B fue el material carbonizado CAR, esta doble carbonización atenúa significativamente las bandas características de este material como el estiramiento  $CH_2$  a  $1400 \text{ cm}^{-1}$  y el enlace  $C-O-C$  cerca de  $850 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 1.** Espectros FT-IR infrarrojos de los bioadsorbentes obtenidos por diferentes tratamientos. (A) Exoesqueletos, EE (B) carbonizados, CAR, (C) exoesqueleto activado con  $H_3PO_4$ , CA1:3A (D) carbonizado activado con  $H_3PO_4$ , CA1:3B.

### Modificaciones con urea

Se realizaron dos tipos de modificaciones con urea. La primera fue con tratamiento directo del EE con la urea seguida de pirolisis obteniéndose el producto EEU. En el otro tipo de tratamiento, el material de partida fue el producto carbonizado (CAR) el cual se trata con la urea seguido de pirolisis. El EEU presentó bandas a  $1680$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$  las cuales son características del enlace  $C=O$  y  $C=N$ , respectivamente. También se observa una banda relacionada con un estiramiento  $C=C$  a  $1460\text{ cm}^{-1}$  y una serie de señales a  $1180$ ,  $1040$  y  $785\text{ cm}^{-1}$  las cuales corresponden a enlaces  $C-O$ ,  $C-N$  y  $C-O-C$ , respectivamente [37]. Por otra parte, el tratamiento con urea del material carbonizado conllevó a la desaparición de las señales relacionadas con los estiramientos  $C=O$  y  $C=N$  observadas en el espectro del material de partida EE modificado con urea a  $1680$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Esto pudo ocurrir por tratamiento de pirolisis formando gases como  $CO_2$  o  $NO_2$ . Igualmente, las insaturaciones de carbono  $C=N$  se transformaron en su mayoría en saturaciones  $C-N$  con una intensidad 6 veces mayor. Adicionalmente, se nota un gran aumento de la banda  $C-O$  y  $C-N$ .

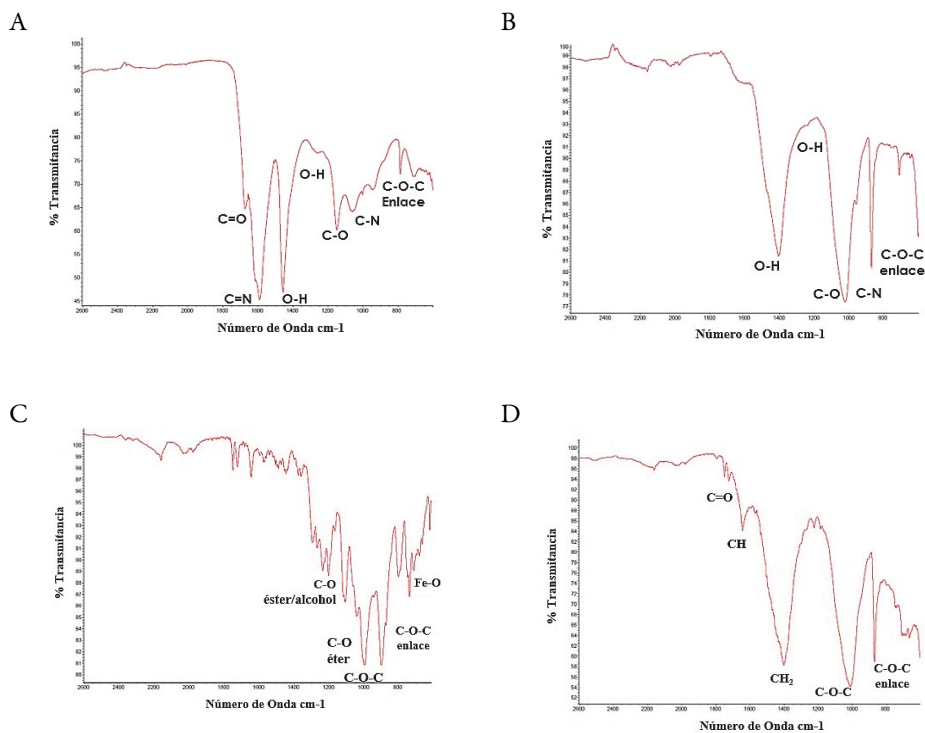
### Modificaciones con magnetita

Se partió del producto carbonizado, el cual se sometió a ultrasonido con una potencia máxima de salida de 750 watt para permitir la desagregación y ruptura del material particulado. Luego se sometió a pirolisis para que el hierro interaccionara químicamente con la estructura carbonosa. El espectro FT-IR muestra una banda a  $1200\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento C-O. Otra señal se presentó a  $1113\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-O-C. También muestra unas bandas a  $720$  y  $790\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a la vibración de los enlaces Fe-O. Además, una banda de Fe-OH se identificó a  $1645\text{ cm}^{-1}$  representando la región de estiramiento de los grupos hidroxilo en la superficie [29] (29). El pico situado en  $610\text{ cm}^{-1}$  se asigna al Fe-O del óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Los picos débiles a  $1502\text{ cm}^{-1}$  y  $1415\text{ cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento C=C. Los picos débiles a  $876\text{ cm}^{-1}$ ,  $815\text{ cm}^{-1}$  y  $675\text{ cm}^{-1}$  están relacionados con el estiramiento de C-C [38].

Aunque el material de partida era magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , el producto resultante modificado mostró presencia de óxido férrico, lo que indica una oxidación. Así, las partículas del precursor actuaron como medio de soporte para evitar la aglomeración de las partículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , haciendo que estas se depositen sobre su superficie.

El espectro FT-IR del carbón activado comercial, muestra señales de C=O y C-O las cuales se extienden entre  $1640$ - $1750\text{ cm}^{-1}$  y se atribuyen al éster fenólico, ácido carboxílico y estructuras cetónicas conjugadas. Igualmente, la intensidad de la banda  $\text{CH}_2$  a  $1400\text{ cm}^{-1}$  muestra que predominan las estructuras cíclicas en este material. En la región entre  $700$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  se aprecian una banda relacionada con anillos aromáticos [39].

La Tabla 3 muestra los resultados de las pruebas fisicoquímicas de los bioadsorbentes, excepto para el material EEU el cual era pastoso e higroscópico y no permitió ser utilizado como adsorbente. Los resultados de la retrotitulación Boehm muestran que los EE tienen una naturaleza prevalentemente alcalina y esta característica aumenta después del tratamiento de carbonización. Esta pirolisis puede ser la responsable del aumento del área superficial. Por el contrario, el tratamiento con ácido fosfórico incrementó netamente la acidez total; esto se corrobora con la presencia de grupos derivados del ácido fosfórico como se discutió en la anteriormente. Así, el PZC del CA1:3A y CA1:3B fueron los más bajos en comparación con los demás materiales. Igualmente, la activación con ácido fosfórico no contribuyó significativamente con el aumento del área superficial. Por el contrario, hizo que el volumen real del material disminuyera. El segundo tratamiento de pirolisis no contribuyó significativamente en la inserción de nuevos grupos funcionales ácidos o básicos. Este tratamiento ácido también hizo que se incorporara la mayor cantidad de grupos fenólicos en la estructura del bioadsorbente.



**Figura 2.** Espectros FT-IR infrarrojos ATR de los bioadsorbentes obtenidos por diferentes tratamientos. (A) Exoesqueleto activado con urea, EEU (B) carbonizado activado con urea, CA1:3U, (C) carbonizado activado con magnetita, CAM, (D) carbón activado comercial, CAC.

El tratamiento con urea y magnetita partiendo del material carbonizado hizo que se incorporaran muchos grupos ácidos y fenólicos aumentando cinco veces más la acidez total, mientras que no tuvieron una gran repercusión en la incorporación de grupos básicos. Por el contrario, estos tratamientos disminuyeron el área superficial específica posiblemente por la adhesión de hierro y grupos aminados sobre la superficie, respectivamente. De estos dos tratamientos, solo el modificado con magnetita muestra un aumento del volumen real del material comparándose con el EE. Adicionalmente, se observa que ninguno de los materiales presentó grupos funcionales tipo lactonas.

**Tabla 3.** Caracterización fisicoquímica de los bioadsorbentes

Material	Método Boehm ( $\mu\text{mol/g}$ )					Área Superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Valores PZC	Volumen real ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Rendimiento (%)
	Acidez Total	Fenoles	Lactonas	Grupos Ácidos	Basicidad Total				
EE	3960	3960	0	0	5850	10,2	2,50	0,55	81,7
CAR	2040	2040	0	0	9350	36,3	2,00	0,37	53,6
CA1:3A	4200	4200	0	0	0	11,4	0,80	0,35	68,2
CA1:3B	4880	4880	0	6750	0	11,4	1,10	0,40	73,3
CA1:3U	10610	3880	0	6720	9970	22,9	2,35	0,39	82,3
CAM	9120	2370	0	6730	9820	20,2	2,30	0,52	84,1
CAC	4320	4320	0	0	950	243,0	3,75	0,62	N/A

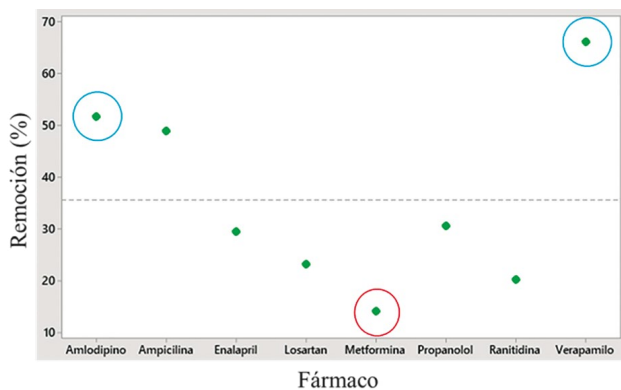
### Capacidad adsorbente de fármacos

Los resultados del análisis de adsorción de fármacos en medio acuoso se muestran en la Figura 3A-B. De todos los tratamientos químicos realizados al EE, solamente el tratamiento con magnetita y urea fueron los que presentaron la mayor capacidad de adsorción para la mayoría de los fármacos, esto se puede evidenciar en el gráfico de adsorción media construido teniendo en cuenta todos los fármacos. Igualmente, los adsorbentes modificados con urea y magnetita mostraron un alto porcentaje de remoción, especialmente para el verapamilo ( $\sim 100\%$ ), amlodipino ( $\sim 70\%$ ) y ampicilina ( $\sim 65\%$ ). Sin embargo, la mayoría de los bioadsorbentes obtenidos no mostraron una buena capacidad de remoción para losartan, enalapril, propranolol y especialmente la metformina, la cual fue el fármaco con peor desempeño con todos los adsorbentes. Solamente, el CAC fue capaz de adsorber la mayoría de los fármacos debido especialmente a su alta área superficial ( $243,0 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

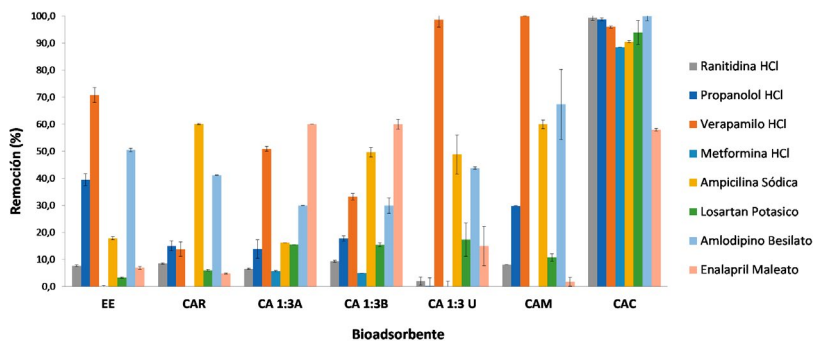
La alta actividad adsorbente de los bioadsorbentes hacia el verapamilo ( $\sim 68\%$ ), y amlodipino ( $\sim 50\%$ ) se explica porque el verapamilo cuenta con cuatro grupos éter unidos a dos anillos bencénicos y además posee un grupo nitrilo. Mientras, que el amlodipino cuenta con cuatro éteres, un clorobenceno y un anillo similar a la piridina. Esto hace que los fármacos estén cargados positivamente respecto al PZC del bioadsorbente ocasionando una prevalencia de interacciones electrostáticas para la adsorción.



A



B



**Figura 3.** (A) Gráfico de eficiencia de remoción media de todos los adsorbentes para cada fármaco. Ampicilina sódica, amlodipino besilato, enalapril maleato, losartan potásico, metformina clorhidrato, propanolol clorhidrato, ranitidina clorhidrato, verapamilo clorhidrato. (B) Porcentajes de remoción de los bioadsorbentes. (EE) Exoesqueletos de Camarón, (CAR) Exoesqueletos Carbonizados, (CA1:3A) Exoesqueletos activados con  $H_3PO_4$ , (CA1:3B) Carbonizado activado con  $H_3PO_4$ , (CA1:3U) Carbonizado activado con Urea, (CAM) Carbonizado activado con Magnetita, (CAC) Carbón Activado Comercial.

### Análisis de componente principal

Para lograr una mejor comprensión de los resultados obtenidos de adsorción y relación con las propiedades fisicoquímicas de los adsorbentes y fármacos estudiados, se llevó a cabo un análisis de componente principal. Este permite reducir la dimensionalidad de un alto conjunto de datos mediante proyecciones lineales que preservan la estructura de los datos y su varianza. El gráfico PCA de todas las propiedades medidas se muestra

en la Figura 4 y representa el 60,4% de la variabilidad de los datos. En el gráfico, las propiedades que contribuyen muy poco a los componentes tienen una baja magnitud y aparecen cerca del centro del gráfico. Por otra parte, las propiedades que más contribuyen se muestran en los extremos del gráfico. Se observan dos grandes grupos, uno relacionado con las propiedades fisicoquímicas del fármaco como el pKa y la solubilidad, mientras el otro grupo está relacionado con las características del adsorbente, como el área superficial específica y PZC. También se observa una relación entre los grupos fenólicos ácidos con la eficiencia de remoción.

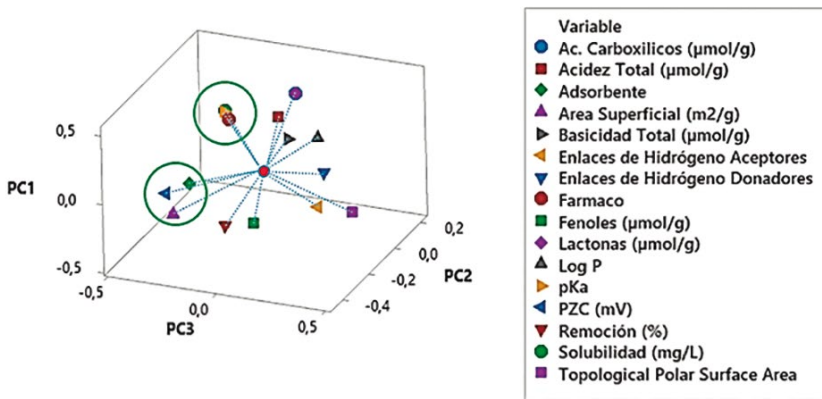


Figura 4. Análisis de componente principal.

## CONCLUSIONES

Los exoesqueletos de camarones puros y activados fisicoquímicamente mediante acidificación con ácido fosfórico, basificación con úrea y formación de complejos magnéticos con magnetita, demostraron tener la capacidad de adsorber un alto porcentaje de diferentes fármacos especialmente amlodipino besilato y verapamilo clorhidrato.

Los bioadsorbentes que presentaron valores de punto de carga cero (PZC) ácidos comprendidos entre 0,80 y 3,75 se hallaban cargados negativamente al pH en el cual se encontraba el medio (entre pH 6,4 y 9,4). Estas características facilitaron la interacción electrostática entre los bioadsorbentes cargados negativamente y los contaminantes con carga positiva, lo que favoreció la remoción especialmente de fármacos cargados positivamente como fue el caso del verapamilo clorhidrato con la mayoría de los adsorbentes.

La incorporación de grupos funcionales de óxido de hierro y grupos tipo aminas derivados de la activación con magnetita (CAM) y urea (CA1:3U), respectivamente, favorecieron la capacidad de adsorción de estos bioadsorbentes para la mayoría de los fármacos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a laboratorios Abbott por permitir la realización de los análisis FT-IR

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

1. D.M. Quijano-Prieto, *Impacto ambiental de los medicamentos. Una aproximación desde el pensamiento ambiental*, Tesis de Maestría en Medio Ambiente y Desarrollo, Universidad Nacional de Colombia, 2016.
2. Organización Mundial de la Salud y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, *Agua, saneamiento, higiene y gestión de desechos en relación con el virus de la COVID-19*, 2020. p. 1-10. URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331929/WHO-2019-nCoV-IPC\\_WASH-2020.3-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331929/WHO-2019-nCoV-IPC_WASH-2020.3-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. M. DellaGreca, M.R. Iesce, M. Isidori, S. Montanaro, L. Previtiera, M. Rubino, Phototransformation of amlodipine in aqueous solution : Toxicity of the drug and its photoproduct on aquatic organisms, *Int. J. Photoenergy*, **2007**, 063459 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1155/2007/63459>
4. A.A. Godoy, F. Kummrow, P.A.Z. Pamplin, Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures, *Ecotoxicology*, **24**(5), 1112-1123 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1455-3>.
5. D.M. Montoya-Rodríguez, E.A. Serna-Galvis, F. Ferraro, R.A. Torres-Palma, Degradation of the emerging concern pollutant ampicillin in aqueous media by sonochemical advanced oxidation processes-Parameters effect, removal of anti-

- crobial activity and pollutant treatment in hydrolyzed urine, *J. Environ. Manage.*, **261**, 110224 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110224>.
6. H.R. Pouretedal, N. Sadegh, Effective removal of amoxicillin, cephalixin, tetracycline and penicillin g from aqueous solutions using activated carbon nanoparticles prepared from vine wood, *J. Water Process Eng.*, **1**, 64-73 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.03.006>.
  7. M. Paredes-Laverde, J. Silva-Agredo, R.A. Torres-Palma, Removal of norfloxacin in deionized, municipal water and urine using rice (*Oryza sativa*) and coffee (*Coffea arabica*) husk wastes as natural adsorbents, *J. Environ. Manage.*, **213**, 98-108 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.047>.
  8. S. Dalahmeh, L. Ahrens, M. Gros, K. Wiberg, M. Pell, Potential of biochar filters for onsite sewage treatment: Adsorption and biological degradation of pharmaceuticals in laboratory filters with active, inactive and no biofilm, *Sci. Total Environm.*, **612**, 192-201 (2018). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.178>.
  9. L. Zhang, F. Sun, D. Wu, W. Yan, Y. Zhou, Biological conversion of sulfamethoxazole in an autotrophic denitrification system, *Water Res.*, **185**, 116156 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116156>.
  10. R.C. Ferreira, H.H.C. de Lima, A.A. Cândido, O.M. Couto Jr, P.A. Arroyo, K.Q. de Carvalho, G.F. Gauze, M.A.S.D. Barros, Adsorption of paracetamol using activated carbon of dende and babassu coconut mesocarp, *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, **9**(7), 717-722 (2015).
  11. D. Shan, S. Deng, T. Zhao, B. Wang, Y. Wang, J. Huang, *et al.*, Preparation of ultrafine magnetic biochar and activated carbon for pharmaceutical adsorption and subsequent degradation by ball milling, *J. Hazard Mater.*, **305**, 156-163 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.047>.
  12. S. Chauhan, T. Shaf, B. Dubey, S. Chowdhury, Biochar-mediated removal of pharmaceutical compounds from aqueous matrices via adsorption, *Waste Dispos. Sustain. Energy*, **5**(1), 37-62 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1007/s42768-022-00118-y>.
  13. S. Mondal, K. Sinha, K. Aikat, G. Halder, Adsorption thermodynamics and kinetics of ranitidine hydrochloride onto superheated steam activated carbon derived from mung bean husk, *J. Environ. Chem. Eng.*, **3**, 187-195 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.11.021>.

14. G.J.P. Fernando, J. Hickling, C.M. Jayashi-Flores, P. Griffin, C.D. Anderson, S.R. Skinner, *et al.*, Safety, tolerability, acceptability and immunogenicity of an influenza vaccine delivered to human skin by a novel high-density microprojection array patch (Nanopatch™), *Vaccine*, **36**, 3779-3788 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.053>.
15. J.R. de Andrade, M.G.C. da Silva, M.L. Gimenes, M.G.A. Vieira, Performance of organoclay in adsorptive uptake of antihypertensive losartan potassium: A comparative batch study using micro-grain activated carbon, *J. Environ. Chem. Eng.*, **8**(3), 103562 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103562>.
16. Y. Wu, W. Liu, Y. Wang, X. Hu, Z. He, X. Chen, *et al.*, Enhanced removal of antibiotic in wastewater using liquid nitrogen-treated carbon material: Material properties and removal mechanisms, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **15**, 2652 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph15122652>.
17. N. Rahman, P. Varshney, Assessment of ampicillin removal efficiency from aqueous solution by polydopamine/zirconium(iv) iodate: optimization by response surface methodology, *RSC Adv.*, **10**, 20322-20337 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1039/D0RA02061C>.
18. X. Weng, W. Cai, R. Lan, Q. Sun, Z. Chen, Simultaneous removal of amoxicillin, ampicillin and penicillin by clay supported Fe/Ni bimetallic nanoparticles, *Environ. Pollut.*, **236**, 562-569 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.100>.
19. R.A. Al-Bayati, A.S. Ahmed, Adsorption studies of enalapril maleate in solution on selected iraqi clays, *Int. J. Chem.*, **3**(3), 134-140 (2011).
20. T. Tokumura, Y. Watarai, Y. Morita, Adsorption of amlodipine besylate to corn starch and microcrystalline cellulose suspended in aqueous solution, *J. Pharm. Sci. Technol.*, **81**(2), 200-204 (2021).
21. M. Amiri, H. Imanzade, Adsorption of amlodipine at the surface of tosyl—carbon nanoparticles for electrochemical sensing, *Iran. J. Pharm. Res.*, **15**(3), 303-311 (2016).
22. A.H. Mohammad, I. Radovic, M. Ivanović, M. Kijevčanin, Adsorption of metformin on activated carbon produced from the water hyacinth biowaste using

- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as a chemical activator, *Sustainability*, **14**(18), 11144 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/su141811144>.
23. M.R. Elamin, B.Y. Abdulkhair, F.K. Algethami, L. Khezami, Linear and nonlinear investigations for the adsorption of paracetamol and metformin from water on acid-treated clay, *Sci Rep.*, **11**, 13606 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93040-y>.
  24. S. Kim, F. Gholamirad, M. Yu, C. Park, A. Jang, M. Jang, *et al.*, Enhanced adsorption performance for selected pharmaceutical compounds by sonicated Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene, *Chem. Eng. J.*, **406**, 126789 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126789>.
  25. Y. Deng, Y. Li, W. Nie, X. Gao, L. Zhang, P. Yang, X. Tan, Fast removal of propranolol from water by attapulgite/graphene oxide magnetic ternary composites, *Materials* (Basel), **12**, 924 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/ma12060924>.
  26. D.C. do Nascimento, M.G.C. da Silva, M.G.A. Vieira, Adsorption of propranolol hydrochloride from aqueous solutions onto thermally treated bentonite clay: A complete batch system evaluation, *J. Mol. Liq.*, **337**, 116442 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116442>.
  27. B.A. Cheba, T.I. Zaghoul, A.R. El-Mahdy, M.H. El-Massry, Effect of nitrogen sources and fermentation conditions on bacillus sp. R2 chitinase production, *Procedia Manuf.*, **22**, 280-287 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.03.043>.
  28. J. Rojas, Y. Ciro, J. Quintero, J. Silva, Comparative evaluation of sonicated shrimp waste hydrolysates as potential fertilizers for legumes, *Am. Soc. Hortic. Sci.*, **54**(9), 1585-1592 (2019). Doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14103-19>.
  29. X. Liu, C. He, X. Yu, Y. Bai, L. Ye, B. Wang, *et al.*, Net-like porous activated carbon materials from shrimp shell by solution-processed carbonization and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation for methylene blue adsorption, *Powder Technol.*, **326**(3), 181-189 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.12.034>.
  30. J. Rojas, D. Suarez, A. Moreno, J. Silva-Agredo, R. Torres-Palma, Kinetics, isotherms and thermodynamic modeling of liquid phase adsorption of crystal violet dye onto shrimp-waste in its raw, pyrolyzed material and activated charcoals, *Appl. Sci.*, **9**, 5337 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/app9245337>.

31. G.L Dotto, J.M. Cunha, C.O. Calgaro, E.H. Tanabe, D.A. Bertuol, Surface modification of chitin using ultrasound-assisted and supercritical CO<sub>2</sub> technologies for cobalt adsorption, *J. Hazard. Mater.*, **295**, 29-36 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.009>.
32. X. Shen, J.L. Shamshina, P. Berton, G. Gurau, R. Rogers, Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications, *Green Chem.*, **18**, 53-75 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1039/C5GC02396C>.
33. G.C. da Fonseca, M. Silva-Oliveira, C.V. Costa-Martins, J.C. Perbone de Souza, How the carbonization time of sugarcane biomass affects the microstructure of biochar and the adsorption process? *Sustainability*, **14**(3) 1571 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/su14031571>.
34. J. Kennedy, Z. Murthy, Activated carbon: classifications, properties and applications, en: J. Kwiatkowski (editor), *Chemical engineering methods and technology*, Nova Science Publishers, New York (NY), 2012. p. 239-267.
35. S.-A. Mohtashami, N.A. Kolar, T. Kaghazchi, R. Asadi-kesheh, M. Soleimani, Optimization of sugarcane bagasse activation to achieve adsorbent with high affinity towards phenol, *Turkish J. Chem.*, **42**(6), 1720-1735 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3906/kim-1806-71>.
36. I. Gan, W. Chow, Tailoring chemical, physical, and morphological properties of sugarcane bagasse cellulose nanocrystals via phosphorylation method, *J. Nat. Fibers*, **18**(10), 1448-1459. Doi: <https://doi.org/10.1080/15440478.2019.1691120>.
37. X. Xu, T. Yuan, Y. Zhou, Y. Li, J. Lu, X. Tian, *et al.*, Facile synthesis of boron and nitrogen-doped graphene as efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction in alkaline media, *Int. J. Hydrogen Energy*, **39**(28), 16043-16052 (2013). Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.079>.
38. H. Xu, X. Zhang, Y. Zhang, Modification of biochar by Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for the removal of pyridine and quinoline pyridine and quinolone, *Environ. Technol.*, **39**(11), 1470-1480 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1332103>.
39. D. Cuhadaroglu, O. Uygun, Production and characterization of activated carbon from a bituminous coal by chemical activation, *African J. Biotechnol.*, **7**(20), 3703-3710 (2008).

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.A. Londoño-Giraldo, K. Barrera-Enriquez, J.J. Rojas-Camargo, Elaboración de un bioadsorbente modificado a partir de los desechos de camarón para la descontaminación de aguas residuales, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 969-993 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110751>



## Acceso a medicamentos en pacientes con cáncer de mama: una revisión narrativa de la literatura

Rolando Enrique Peñaloza Quintero<sup>1a</sup>, Manuel Alejandro Machado Beltrán<sup>2a</sup>, Camilo Agudelo Orozco<sup>1b</sup>, Yesika Tatiana Hernández Sandoval<sup>1c</sup>, María Alexandra Matallana Gomez<sup>1d</sup>, Angélica María Zapata Matheus<sup>1c</sup>, Laura Vanessa Peña Peña<sup>1f</sup>, Andrea Carolina Reyes Rojas<sup>2b</sup>, Jhonathan Felipe Venegas<sup>2c</sup>, Jennifer Bueno Rocha<sup>2d</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 # 40-62, Bogotá D.C., Colombia

<sup>2</sup>Fundación Misión Salud, Cl. 1F # 19B-29, Bogotá D.C., Colombia

ORCID

<sup>1a</sup><https://orcid.org/0000-0003-0689-487X>, <sup>2a</sup><https://orcid.org/0000-0002-2396-0181>,

<sup>1b</sup><https://orcid.org/0000-0002-3351-4935>, <sup>1c</sup><https://orcid.org/0000-0002-9721-9927>,

<sup>1d</sup><https://orcid.org/0000-0001-6218-902X>, <sup>1e</sup><https://orcid.org/0000-0002-3285-6829>,

<sup>1f</sup><https://orcid.org/0000-0002-4904-6742>, <sup>2b</sup><https://orcid.org/0000-0001-6858-4848>,

<sup>2c</sup><https://orcid.org/0000-0002-0472-9910>, <sup>2d</sup><https://orcid.org/0000-0001-6526-8460>

Correos electrónicos:

<sup>1a</sup>[epenaloza@javeriana.edu.co](mailto:epenaloza@javeriana.edu.co), <sup>2a</sup>[manuel.machado@mision-salud.org](mailto:manuel.machado@mision-salud.org),

<sup>1b</sup>[cagudelo@javeriana.edu.co](mailto:cagudelo@javeriana.edu.co), <sup>1c</sup>[cythernandezs@hotmail.com](mailto:cythernandezs@hotmail.com),

<sup>1d</sup>[mamata@javeriana.edu.co](mailto:mamata@javeriana.edu.co), <sup>1e</sup>[anzapata@javeriana.edu.co](mailto:anzapata@javeriana.edu.co), <sup>1f</sup>[laurapenap@javeriana.edu.co](mailto:laurapenap@javeriana.edu.co),

<sup>2b</sup>[acreyesr@gmail.com](mailto:acreyesr@gmail.com), <sup>2c</sup>[jhonathanvenegas@gmail.com](mailto:jhonathanvenegas@gmail.com), <sup>2d</sup>[jenbueno@gmail.com](mailto:jenbueno@gmail.com)

Recibido: 28 de febrero de 2023

Revisado: 15 de julio de 2023

Aceptado: 27 de julio de 2023

## RESUMEN

**Introducción:** en la actualidad existe un problema mundial relacionado con el acceso a los medicamentos esenciales por parte de las poblaciones, razón por la cual organismos internacionales como la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud han manifestado su preocupación por garantizar el derecho a la salud para todos, en especial para quienes padecen patologías de alta prevalencia y mortalidad como es el caso del cáncer de mama, por lo que

resulta de interés explorar barreras de acceso. **Objetivo:** realizar una síntesis narrativa para identificar elementos que puedan repercutir en el acceso y uso de medicamentos para el tratamiento del cáncer de mama. **Metodología:** se realizó una revisión narrativa consistente en cinco fases: I) búsqueda bibliográfica, II) revisión por título y resumen, III) Revisión de texto completo y IV) selección de las referencias y V) Análisis descriptivo. **Resultados:** se identificaron barreras individuales para el acceso como el bajo poder adquisitivo en pacientes, el bajo nivel educativo, los requerimientos de largos desplazamientos para la obtención de los medicamentos y elementos de discriminación social. Por otro lado, a nivel institucional y de sistemas de salud se detectaron dificultades en los trámites para acceder a los tratamientos, falta de coordinación entre instituciones, barreras en regulación de precios y poca disponibilidad de medicamentos. **Conclusiones:** los hallazgos ofrecen un acercamiento en proponer soluciones y alternativas para la estructuración de políticas en salud pública que garanticen el acceso a medicamentos a cáncer de mama a los pacientes que lo requieran.

**Palabras clave:** Neoplasias de la mama, acceso a medicamentos esenciales y tecnologías sanitarias, literatura de revisión como asunto.

## SUMMARY

### Access to medicines in patients with breast cancer: A narrative review of the literature

**Introduction:** Currently, there is a global problem related to access to essential medicines by populations, which is why international organizations such as the Panamerican Health Organization and the World Health Organization have expressed their concern to guarantee the right to health for all, especially for those who suffer pathologies with high prevalence and mortality such as breast cancer, so it is of great interest to explore access barriers. **Aim:** To conduct a narrative synthesis to identify elements that may have an impact on access and use of medicines for the treatment of breast cancer. **Methodology:** a narrative review was carried out, it consisted of five phases: I) bibliographic search, II) review of titles and abstracts, III) full text review, IV) selection of references, and V) descriptive analysis. **Results:** Individual barriers to access were identified, such as low purchasing power in patients, low educational level, long travel requirements to obtain medicines, and elements of social discrimination. On the other hand, at the institutional and health system level, difficulties were detected in the procedures to access treatments, lack of coordination between

institutions, barriers in price regulation, and little availability of medicines. **Conclusions:** The findings offer an approach to proposing solutions and alternatives for the structuring of public health policies that guarantee access to breast cancer medicines to patients who require it.

**Keywords:** Breast neoplasms, access to essential medicines and health technologies, review literature as topic.

## RESUMO

### Acesso a medicamentos em pacientes com câncer de mama: uma revisão narrativa da literatura

**Introdução:** atualmente, existe um problema global relacionado ao acesso a medicamentos essenciais pelas populações, razão pela qual organizações internacionais como a Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde têm manifestado sua preocupação em garantir o direito à saúde para todos, especialmente para aqueles que sofrem de patologias de alta prevalência e mortalidade como o câncer de mama, por isso é interessante explorar as barreiras de acesso. **Objetivo:** realizar uma síntese narrativa para identificar elementos que possam interferir no acesso e uso de medicamentos para o tratamento do câncer de mama. **Metodologia:** foi realizada uma revisão narrativa composta por cinco fases: I) pesquisa bibliográfica, II) revisão por título e resumo, III) revisão do texto completo e IV) seleção de referências e V) análise descritiva. **Resultados:** foram identificadas barreiras individuais ao acesso, como baixo poder aquisitivo dos pacientes, baixa escolaridade, necessidade de viagens de longa distância para obtenção de medicamentos e elementos de discriminação social. Por outro lado, ao nível institucional e dos sistemas de saúde, foram detectadas dificuldades nos procedimentos de acesso ao tratamento, falta de coordenação entre instituições, barreiras na regulação de preços e pouca disponibilidade de medicamentos. **Conclusões:** os achados oferecem uma abordagem para propor soluções e alternativas para a estruturação de políticas públicas de saúde que garantam o acesso a medicamentos para o câncer de mama às pacientes que o necessitam.

**Palavras-chave:** Neoplasias da mama, acesso a medicamentos essenciais e tecnologias de saúde, literatura de revisão como assunto.

## INTRODUCCIÓN

Para el año 2018 se estimaba que a nivel global fueron diagnosticadas 18,1 millones de personas con cáncer y otros 9,6 millones murieron por esta causa, siendo el cáncer de mama uno de los más prevalentes, destacado por ocupar el primer lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres. Junto con el cáncer de pulmón, las neoplasias malignas de mama generaron 2,1 millones de nuevos casos en 2018, lo que representó cerca del 11% del total de carga de cáncer a nivel mundial [1].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que los medicamentos usados para el tratamiento de cáncer de mama son esenciales. El acceso equitativo a estos es de importancia vital en la agenda para la equidad en salud, contribuye al logro del grado máximo de salud que se puede obtener para la población y es la forma más exitosa de reducir significativamente la mortalidad por esta causa [2]. Lo anterior se refleja también en una de las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS consistente en “el acceso a medicamentos y vacunas seguros, eficaces, asequibles y de calidad para todos” [3].

El acceso a medicamentos se puede definir de manera operacional como “el proceso de verificación de la obtención de un fármaco por un paciente, independiente de diversos factores que pueden afectar el proceso” [4]; el acceso a los medicamentos esenciales deriva del derecho fundamental a la salud, por tratarse de elementos indispensables para la prevención de las enfermedades y su tratamiento. Sin un acceso equitativo a los productos sanitarios necesarios para tratar las necesidades prioritarias -ha sostenido la OMS- no es posible gozar del derecho fundamental a la salud [5].

La carga de enfermedad y muerte por cáncer de mama en sinergia con la falta de acceso a medicamentos esenciales para su tratamiento ha posicionado este fenómeno como un problema de salud pública que debe ser priorizado en las agendas gubernamentales [5].

Según el Instituto Nacional de Cancerología, el cáncer fue la segunda causa de muerte durante el periodo 2007-2013, y representó el 17,1% de la mortalidad en el país [6]. En Colombia, el cáncer de mama es el tipo de tumor maligno más frecuente en la población total, concentrado en las mujeres [7]. En las cifras generales sobre el tratamiento del cáncer de mama reportadas por la Cuenta de Alto Costo para 2017, se mostró que sólo el 27% (8.956) de los 38.818 casos nuevos registrados de cualquier tipo de cáncer tuvieron acceso a medicamentos; el porcentaje restante (73% - 23.862) no fue reportado por las Empresas Administradoras de Planes de Beneficios (EAPB) o hay deficiencias en la gestión de esta información por parte de las aseguradoras [8].

El grado y la temporalidad del acceso a un tratamiento o a cuidados paliativos de las mujeres que padecen cáncer de mama tiene una fuerte influencia en resultados de incidencia, supervivencia, e incluso calidad de vida [9]. Se ha descrito que en América Latina existe una razón de mortalidad-incidencia más alta que en los países europeos y Norteamérica [1], diferencia que puede ser explicada por el alto nivel de inequidad social, bajo estatus socioeconómico [10], el mal pronóstico en cáncer de mama [11] y acceso deficiente a los servicios de salud que resulta en una alta proporción de diagnóstico tardío reportada para la región [12].

Sobre el último elemento, y para el caso de Colombia, se conoce que aproximadamente del 40% al 50% de los casos registrados en el Instituto Nacional de Cancerología, fueron diagnosticados en estadio III o mayor [13].

Así, el objetivo de esta investigación fue realizar una síntesis narrativa con el fin de identificar posibles factores que pueden repercutir de manera directa o indirecta en el acceso y uso de medicamentos para el tratamiento de cáncer de mama, evidenciando elementos relacionados con la dinámica del uso de medicamentos para el manejo de este cáncer.

## METODOLOGÍA

Para dar alcance al objetivo del presente trabajo se procedió de la siguiente manera:

### **Búsqueda bibliográfica**

Se consultaron diferentes fuentes de información contenida en bases de datos nacionales e internacionales por medio de ecuaciones de búsqueda determinadas, lo que implicó la definición previa de criterios para seleccionar los documentos relacionados con el tema de síntesis. También se incluyeron otras fuentes, como las referencias seleccionadas de la bibliografía de los artículos incluidos previamente, así como búsqueda manual y literatura gris. La consulta de la información se llevó a cabo en las bases de datos de revistas científicas, como EBSCO Host, PubMed y BVSsalud; en los idiomas inglés y español, usando las siguientes ecuaciones de búsqueda: inglés: (“Access to medicine\*” OR “Access to medication\*” OR “Access to treatment\*”) AND (“Breast Neoplasm\*” OR “Breast cancer”). Español: “Acceso a medicamento\*” OR “Acceso a\* tratamiento\*” AND (“Cáncer de mama” OR “Cáncer de seno” OR “Neoplasma de seno” OR “neoplasma de mama”).

### **Revisión por título y resumen**

Una vez hechas las búsquedas en las distintas fuentes de información, dos revisores de manera independiente contrastaron las referencias por título y resumen para preseleccionar referencias elegibles. El principal criterio de inclusión fue el empleo de cualquier metodología o revisión que permitieran identificar factores, alternativas o variables que evidenciaran de qué manera se da el acceso a medicamentos para el tratamiento del cáncer de mama.

### **Revisión por texto completo**

El siguiente proceso consistió en la revisión completa de los textos preseleccionados para incluir en el grupo de referencias seleccionadas. En los casos en los que se presentaron desacuerdos, se programaron sesiones conjuntas para llegar a un consenso. Si la discrepancia persistía se acudió al concepto de un tercer revisor.

### **Selección de Referencias**

Si el estudio cumplía con todos los criterios de inclusión se clasificaba como un “estudio incluido”, de lo contrario era catalogado como “estudio excluido” con previa justificación del motivo. Lo anterior mediante una hoja de cálculo Excel®.

### **Análisis Descriptivo**

Una vez seleccionadas las referencias se procedió con la categorización de resultados mediante la codificación abierta e iterativa, que permitió identificar las semejanzas y las diferencias de los estudios; en consecuencia, de manera inicial se conceptualizaron los temas más recurrentes y posteriormente se detectaron subcategorías para algunos ejes temáticos. Finalmente, se procedió con un análisis descriptivo de cada categoría.

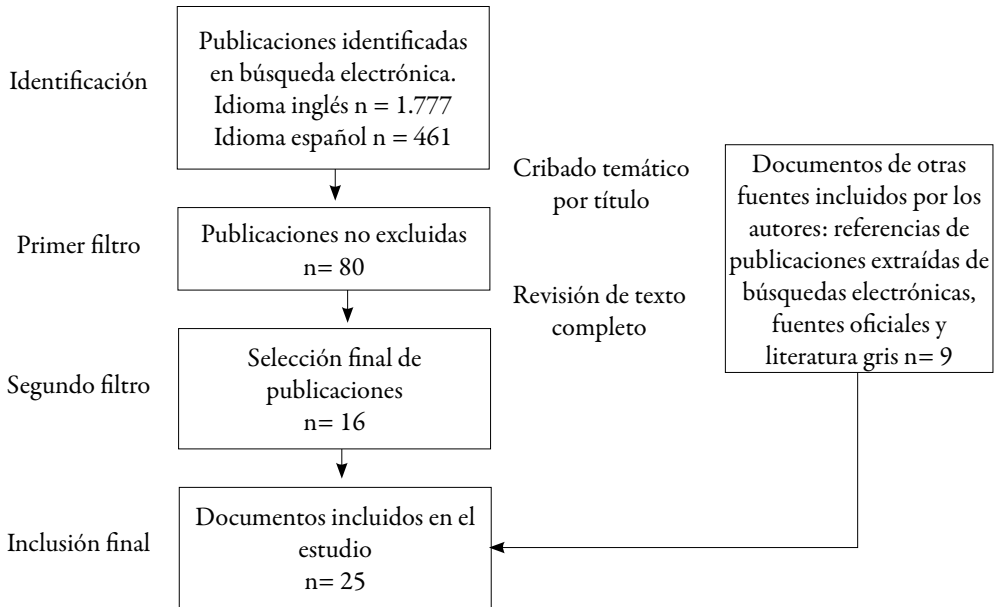
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Referencias incluidas en la revisión**

Se recuperaron 2.238 referencias al aplicar las ecuaciones de búsqueda en las diferentes bases de datos. Al efectuar la revisión por título, resumen y texto completo se incluyeron 9 referencias que cumplieron con los criterios de inclusión. Con la revisión de referencias y literatura no publicada se incluyeron 11 referencias adicionales para un total de 25. El proceso de búsqueda e inclusión de documentos se describe en la Figura 1.

Es de resaltar que en las referencias se detectaron comparaciones entre países de medianos y bajos ingresos, estadísticas e información de Latinoamérica, Colombia, Brasil,

Australia, Reino Unido, Estados Unidos y Australia, China, Nigeria y Sur África. Los detalles de las características de los estudios se resumen en la tabla 1 y su análisis bibliométrico se describe a continuación.



**Figura 1.** Diagrama PRISMA para la identificación e inclusión de referencias al estudio

**Tabla 1.** Características de las publicaciones seleccionadas

Autor principal y año	Título	Metodología	Principal hallazgo
Barrios <i>et al.</i> (2019) [14]	Access to high-cost drugs for advanced breast cancer in Latin America, particularly trastuzumab	Revisión teórica	El acceso a las terapias anti-HER2 en Latinoamérica depende del contexto y de una participación de diferentes actores.
Bazargani <i>et al.</i> (2015) [15]	Essential medicines for breast cancer in low- and middle-income countries	Revisión de Medicamentos incluidos en las listas nacionales	Las recomendaciones de las guías fueron inconsistentes entre los países, por lo tanto se recomiendan actualizaciones periódicas y más atención a las guías clínicas.

(Continúa)

Autor principal y año	Título	Metodología	Principal hallazgo
Bray <i>et al.</i> (2018) [1]	Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries	Estimación de incidencia mortalidad	Las estimaciones de GLOBOCAN 2018 presentadas en este informe indican que habrá 18,1 millones de nuevos casos de cáncer y 9,6 millones de muertes por cáncer en 2018.
ECLAC (2019) [10]	Social panorama of Latin America 2018	Encuestas, revisión teórica	En América Latina existe una razón de mortalidad-incidencia más alta que en países europeos y Norteamérica, explicada por el alto nivel de inequidad social en la región.
De Charry <i>et al.</i> (2008) [16]	Equidad en la detección del cáncer de seno en Colombia	Estudio de cohorte retrospectivo y con encuesta	La falta de equidad puede expresarse en una mala distribución de la respuesta a las necesidades de salud que conduce a inequidad en el uso y acceso a los servicios de salud
Clark <i>et al.</i> (2009) [17]	Addressing social determinants of health to improve access to early breast cancer detection: Results of the boston reach 2010 breast and cervical cancer coalition women's health demonstration project	Estudio de cohorte prospectivo	Se encontró un aumento significativo en la captación del cribado.
Cuomo <i>et al.</i> (2017) [18]	Country and regional variations in purchase prices for essential cancer medications	Evaluación de variación de precios	La revisión de medicamentos esenciales contra el cáncer exhibe precios más altos que otras categorías de medicamentos esenciales. Es posible que los precios de los medicamentos esenciales contra el cáncer disminuyan después de la introducción de un producto genérico.

(Continúa)



Autor principal y año	Título	Metodología	Principal hallazgo
Cuomo y Mackey (2017) [19]	The availability of essential cancer medication: An analysis of national formularies	Evaluación de la lista de Medicamentos Esenciales de la OMS	Se encontró evidencia de variación en los precios pagados por los sistemas de salud para adquirir medicamentos esenciales contra el cáncer.
Deprá <i>et al.</i> (2015) [20]	Estratégias de instituições da sociedade civil no acesso a medicamentos para câncer de mama no SUS	Entrevistas semiestructuradas	Los entrevistados mencionaron que el acceso a la medicación a través de la justicia representa la garantía del derecho a la salud, pero hubo divergencia de opiniones sobre los límites del uso de este medio
Farias <i>et al.</i> (2020) [21]	Racial/ethnic differences in patient experiences with health care in association with earlier stage at breast cancer diagnosis: findings from the SEER-CAHPS data	Evaluación del consumidor de proveedores y sistemas de atención médica	Las minorías raciales informaron peores experiencias con relación a la atención antes de un diagnóstico de cáncer de mama.
Farmer <i>et al.</i> (2010) [22]	Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: A call to action	Identificación y exploración de iniciativas, la atención y el control del cáncer	Incluir el tratamiento de cáncer en los seguros de los países reducen los costos y aumentan el acceso a los servicios de salud
Fix the patent laws (2016) [23]	Patent barriers to medicine access in South Africa: A case for patent law reform	Estudio de caso. Caso de acceso a Trastuzumab en Sur África	Combinación de costos y patentes, barreras de acceso. Caso de Trastuzumab con patente prolongada que genera barreras de acceso.
Lu <i>et al.</i> (2018) [11]	The fluctuating incidence, improved survival of patients with breast cancer, and disparities by age, race, and socioeconomic status by decade, 1981–2010	Registros de epidemiología para evaluar la supervivencia	Se demostraron las características fluctuantes de la incidencia y modesta mejora de la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama durante el período de 3 décadas.

(Continúa)

Autor principal y año	Título	Metodología	Principal hallazgo
Hill <i>et al.</i> (2017) [24]	Estimated generic prices of cancer medicines deemed cost-ineffective in England: a cost estimation analysis	Análisis de datos sobre ingredientes farmacéuticos	Los hallazgos demostraron que los costos de tratamiento farmacológico asequibles son posibles para los nuevos medicamentos contra el cáncer
Hill <i>et al.</i> (2016) [25]	Target prices for mass production of tyrosine kinase inhibitors for global cancer treatment	Análisis sobre ingredientes farmacéuticos activos	La producción masiva de genéricos de varios medicamentos de tirosina quinasa podría lograr disminuir los precios
Lammers <i>et al.</i> (2014) [26]	Barriers to the Use of Trastuzumab for HER2+ Breast Cancer and the Potential Impact of Biosimilars: A Physician Survey in the United States and Emerging Markets	Encuesta de participación voluntaria a oncólogos	Las empresas farmacéuticas necesitan recuperar inversiones en investigación y desarrollo para seguir siendo económicamente viables
Monk <i>et al.</i> (2017) [27]	Barriers to the Access of Bevacizumab in Patients with Solid Tumors and the Potential Impact of Biosimilars: A Physician Survey	Encuestas a prescriptores y porcentaje de uso	Un gran porcentaje de médicos citaron las barreras en acceso como barreras para prescribir los medicamentos
Okoronkwo <i>et al.</i> (2015) [28]	Financial barriers to utilization of screening and treatment services for breast cancer: an equity analysis in Nigeria	Entrevista a mujeres atendidas en una institución oncológica.	Las barreras financieras limitan la capacidad de las mujeres para utilizar los servicios de detección y tratamiento para el diagnóstico y tratamiento precoces del cáncer de mama.
Piñeros <i>et al.</i> (2011) [29]	Demoras en el diagnóstico y tratamiento de mujeres con cáncer de mama en Bogotá, Colombia	Estudio en mujeres que recibían tratamiento por cáncer	Existen inequidades tanto en diagnóstico como tratamiento a las mujeres según educación, afiliación al sistema de salud y estrato socioeconómico.

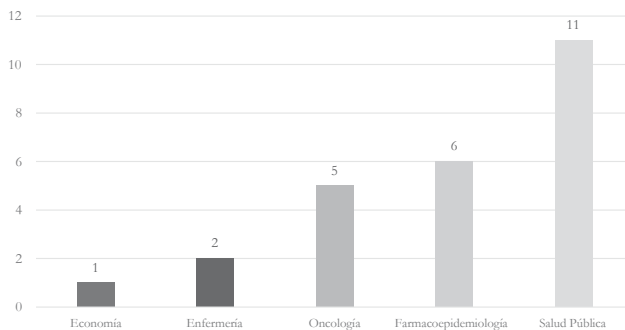
(Continúa)

Autor principal y año	Título	Metodología	Principal hallazgo
de Lemos <i>et al.</i> (2019) [12]	Stage at diagnosis and stage-specific survival of breast cancer in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis	Revisión sistemática y metaanálisis	En Latinoamérica y el Caribe, el acceso inadecuado a los servicios de salud, junto con el diagnóstico en estadios avanzados, se asocia con la alta razón mortalidad-incidencia de la región
Ramaswami <i>et al.</i> (2014) [30]	Activity of eribulin mesylate in heavily pretreated breast cancer granted access via the Cancer Drugs Fund	Estudio de cohorte	No hubo diferencias significativas en los pacientes de la cohorte vs los que utilizaron antraciclina o taxanos
Ramjan <i>et al.</i> (2016) [31]	Barriers to breast and cervical cancer screening for women with physical disability: A review	Revisión	Las mujeres con discapacidades pueden experimentar barreras físicas, ambientales, psicológicas y de actitud cuando se someten a exámenes de detección de cáncer de mama o de cuello uterino.
Restrepo-Zea <i>et al.</i> (2014) [32]	Acceso a servicios de salud: análisis de barreras y estrategias en el caso de Medellín, Colombia.	Investigación analítica y explicativa de acceso	Se resalta de manera específica la importancia de las barreras administrativas y estructurales del sistema
Arias (2009) [9]	Inequidad y cáncer: una revisión conceptual	Revisión conceptual	Las poblaciones socialmente vulnerables tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer, morir más pronto por la enfermedad y sufrirla
Sánchez <i>et al.</i> (2014) [33]	Barreras de acceso a los servicios de salud: narrativas de mujeres con cáncer de mama en Colombia	Estudio cualitativo descriptivo interpretativo	Problemática de inequidad social siendo las mujeres de menores recursos económicos quienes enfrentan mayores barreras de acceso

(Continúa)

## Resultados bibliométricos

**Filiación del autor principal:** Las publicaciones presentaron un promedio de 6 autores por publicación con mediana de 5. Llama la atención que la publicación de Farmer *et al.* [22], presenta veintitrés autores siendo la de mayor cantidad de las referencias recuperadas. Sobre la filiación del autor principal, once referencias (44%) tenían como dependencia departamentos en salud pública, seis (24%) estaban vinculadas a unidades de investigación en farmacoepidemiología y cinco (20%) en oncología. Tales resultados son esperados ya que los estudios incluidos tratan de temas de acceso a medicamentos y tecnologías sanitarias en cáncer. La figura 2 ofrece la discriminación correspondiente:

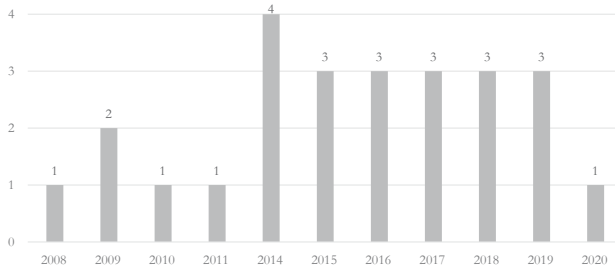


**Figura 2.** Filiación del autor principal.

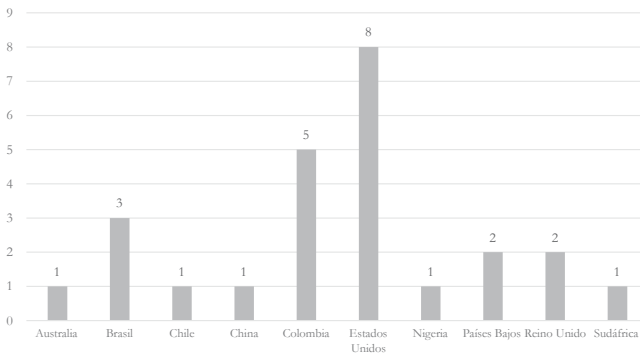
**Año de publicación:** La publicación más antigua es de De Charry *et al.* [16], mientras que la más reciente es de 2020, consistente en una investigación hecha por Farias *et al.* [21]; cuatro publicaciones (16%) fueron realizadas en el 2014 siendo el año de mayor frecuencia (Fig. 3).

**Idioma de las publicaciones:** Veinte (80%) publicaciones se encontraron publicadas en idioma inglés, cuatro (16%) en español y sólo una (4%) en portugués, resultado esperado ya que el inglés suele ser el más común a la hora de publicar resultados de investigación, incluso si es un país de habla diferente.

**País de publicación:** Estados Unidos fue el país con mayor frecuencia de publicaciones para un total de ocho (32%), resultado esperado ya que es un país de alta prevalencia en cáncer de mama y por consiguiente, se espera un mayor interés investigativo en esa área. Por otro lado Colombia y Brasil contaron con cinco (20%) y tres publicaciones (12%) respectivamente.

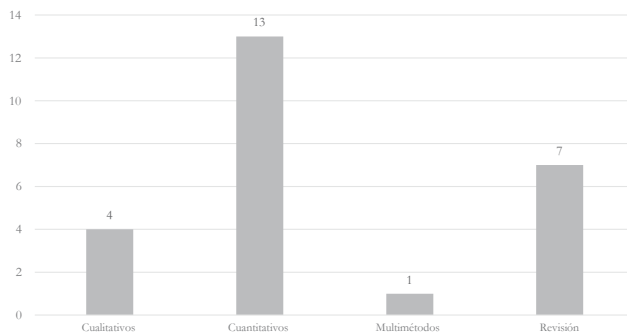


**Figura 3.** Año de publicación.



**Figura 4:** País de publicación.

**Tipos de estudios:** Se encontraron siete referencias (28%) consistentes en artículos de revisión, de la cual se resalta aquella realizada por Pires de Lemos *et al.* [12] quienes realizaron una revisión sistemática con metaanálisis, las restantes consistieron en revisiones conceptuales. Cuatro de los estudios (16%) fueron de tipo cualitativo y emplearon estrategias metodológicas consistentes en entrevistas semiestructuradas o en estudios de caso. La mayoría de los estudios consistieron en Estudios de Utilización de Medicamentos (52%) en el que se aplicaron cohortes retrospectivas para recolectar información en cáncer de mama (n=5), variaciones en precio de medicamentos (n=1) encuestas a prescriptores sobre uso de medicamentos en cáncer (n=3), estimación de mortalidad (n=1), entre otros particulares (n=3). Un estudio utilizó la multimetodología, consistente en una revisión teórica y aplicación de encuestas de tipo cuantitativo [10], resultado esperado ya que los Estudios de Utilización de Medicamentos y aquellos enfocados en epidemiología suelen ser de tipo cuantitativo. No obstante futuras investigaciones podrían estudiar el fenómeno desde un paradigma cualitativo que complementen los resultados encontrados.



**Figura 5:** Tipos de estudios

### Resultados y discusión del análisis iterativo

El análisis de datos sobre los factores que afectan el acceso y uso de medicamentos, para el tratamiento de cáncer de mama arrojó, cinco categorías principales: 1) Acceso a medicamentos desde la oferta o el mercado (Costo de los medicamentos y disponibilidad de los medicamentos); 2) Acceso a medicamentos desde la demanda; 3) Determinantes de acceso identificados por los profesionales de la salud; 4) Determinantes de acceso establecidos o atribuibles a las instituciones y los sistemas de salud; 5) Intervenciones para aumentar el acceso equitativo a los medicamentos. Adicionalmente, se usaron algunas referencias para la contextualización de la problemática abordada previamente.

#### *1) Acceso a medicamentos desde la oferta (Costo de los medicamentos y Disponibilidad de los medicamentos)*

Esta categoría hace referencia a limitantes en el acceso visto desde el Costo de los medicamentos y Disponibilidad de los mismos en el mercado. En este caso, las referencias seleccionadas indicaban estrecha relación del impacto negativo de la aplicación de los Derechos Propiedad Intelectual (PI) en el acceso a medicamentos.

Las patentes involucradas con medicamentos y tecnologías sanitarias suelen ser controversiales, por las implicaciones en salud pública que conlleva. La controversia ha generado posiciones divididas: algunos actores consideran que la PI en salud atentan contra la salud pública y otros la ven como un medio para estimular la investigación. Otros autores sostienen que la industria farmacéutica utiliza diversas estrategias legales para impedir y retrasar el ingreso de genéricos y biosimilares al mercado [34, 35]. Una posible solución podría ser buscar un equilibrio entre intereses económicos y la salud pública. Otros actores son más radicales e insisten en que las patentes no se apliquen a

medicamentos u otras tecnologías sanitarias. También se propone formulación de normativas que amparen los intereses de la salud pública por encima de los económicos.

Ejemplo de tales aplicaciones en PI que limitan el acceso se evidenciaron dentro de los hallazgos de las referencias incluidas en la revisión. Se destaca el caso del Trastuzumab, fármaco de origen biológico utilizado en cáncer de mama positivo para proteínas HER-2. Al respecto, el estudio realizado por *Fix the Patent Laws Campaign* [23], encontró que el acceso en Sudáfrica a este medicamento es limitado y se concentra en el sector privado ya que las patentes otorgadas a dichos productos impiden adquirir medicamentos biosimilares que motiven la competencia y la caída de los precios.

Estos hallazgos son congruentes con los resultados de otras investigaciones. Una revisión sistemática hecha por de Tenni *et al.* [36], en la que concluyeron que medidas asociadas con PI-Plus se asocian más con limitar el acceso a medicamentos por el aumento de precios, demora en la disponibilidad y aumento de costos en el sistema de salud.

Respecto al caso de altos precios en los tratamientos, se ejemplifica con el estudio de Cuomo *et al.*, quienes evaluaron la disponibilidad de medicamentos oncológicos esenciales en 29 países entre el año 2010 y 2014. Se encontró que este tipo de fármacos suelen ser los de precios más altos, dentro de los cuales el biológico Trastuzumab fue en promedio el medicamento de precio más elevado, generando menor posibilidad de compra para los países de bajos y medianos ingresos [18]. El fenómeno también se apreció en países de América Latina en donde se deben usar quimioterapias estándar, con mayor riesgo de reacciones adversas y, en general, menos efectivas en el tratamiento del cáncer de mama por la poca disponibilidad del fármaco mencionado [14]. En el estudio de Lammers *et al.* [26], alrededor de la mitad de los médicos oncólogos entrevistados informaron que de existir un biosimilar de menor costo, específicamente Trastuzumab, incrementarían el uso de la terapia anti-HER2, teniendo en cuenta que es el tratamiento de elección para el cáncer de mama HER2+.

## 2) Acceso a medicamentos desde la demanda

Hace referencia a los limitantes en acceso visto desde la perspectiva de los pacientes y su relación con la inequidad social. Uno de los principales hallazgos se evidencia en el estudio realizado por De Charry *et al.* [16] acerca del acceso a cirugía, quimioterapia y radioterapia en instituciones habilitadas para estos tratamientos en algunas ciudades de Colombia, el cual encontró que hay diferencias significativas en las mujeres afiliadas al régimen contributivo y de mayor nivel educativo, quienes tenían mayor probabilidad de tener diagnósticos y tratamientos oportunos. Las barreras encontradas para las mujeres de régimen subsidiado fueron los largos desplazamientos, los trámites administrativos y el costo de los tratamientos. Además de estas barreras geográficas y

culturales, Arias [9] reportó que las redes de apoyo pueden suplir el déficit social de las mujeres enfermas para que puedan mejorar su adherencia al tratamiento.

Hallazgos similares fueron detectados en el estudio descriptivo desarrollado en Nigeria con 270 mujeres, que concluyó que disminuir las barreras financieras para las mujeres del grupo socioeconómico pobre, aumentaría la utilización de los servicios de detección temprana y tratamiento para el cáncer de mama [28].

Otros estudios han analizado el acceso a los tratamientos desde el enfoque diferencial, como los realizados por Farias *et al.* [21], así como Ramjan *et al.* [31]. En el primer caso, se exploraron las diferencias raciales de una cohorte de mujeres en Estados Unidos, encontrando que las mujeres de descendencia afroamericana son diagnosticadas con cáncer de mama en un estadio tardío con mayor frecuencia comparado con mujeres caucásicas y que, para las primeras, el obtener los medicamentos prescritos requeridos es un proceso de mayor complejidad. El segundo estudio se enfocó en las mujeres con discapacidad física ya que las mujeres con estas condiciones suelen usar menos servicios preventivos, hecho que pudiera estar asociado con un diagnóstico tardío y por ende, no acceder a un tratamiento oportuno. Para este caso, se encontró que las principales dificultades en el acceso a tratamientos incluyen factores sociodemográficos como la pobreza, dificultades en el aseguramiento en salud, dificultades laborales con los trabajadores de la salud y barreras físicas, y un menor nivel de acceso a los servicios de diagnóstico.

### *3) Determinantes de acceso identificadas por los profesionales de la salud*

Esta categoría menciona las barreras que enfrentan las mujeres para acceder al diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama desde la perspectiva de los prescriptores. La investigación realizada por Lammers *et al.* [26] en oncólogos de Estados Unidos, México, Turquía y Brasil, sobre el acceso a tratamientos para cáncer de mama, identificaron que las barreras más comunes para acceder a dicho medicamento fueron las relacionadas con el aseguramiento, la disponibilidad del fármaco y el costo para las pacientes. Otro hallazgo en la misma investigación resalta que alrededor del 50% de los médicos oncólogos entrevistados informaron que de existir un biosimilar de menor costo, específicamente a Trastuzumab, incrementarían el uso de este para la terapia anti-HER2, teniendo en cuenta que es el tratamiento de elección.

Estos hallazgos convergen con resultados de otras investigaciones. Por ejemplo, en el estudio de Monk *et al.* [27], se entrevistaron a médicos de Estados Unidos, Europa, Brasil, México y Turquía para identificar las barreras de acceso a Bevacizumab, fármaco empleado en estadios avanzados de cáncer de mama. Dentro de sus hallazgos encontraron que las principales dificultades a la hora de prescribir dicho fármaco se encontraban



el costo de los medicamentos, deficiencias en los sistemas de salud y la no disponibilidad de biosimilares, siendo este último determinante para los profesionales.

En Colombia, un estudio que analizó la perspectiva de diferentes actores dentro del sistema de salud estableció que la mayor parte de las barreras de acceso se concentraron en dos situaciones: la consecución del tratamiento y la continuidad de éste. Los determinantes de acceso fueron características sociales de la población como el nivel de conocimiento sobre el sistema de salud y la pertenencia a redes de apoyo, así como características de los prestadores de servicios de salud y el sistema de salud entre las que se destaca la necesidad de prescripción del medicamento requiera de citas con especialistas médicos y finalmente, que el medicamento requerido no esté incluido en el Plan de Beneficios en Salud [32].

Estos hallazgos muestran que es necesario realizar más estudios que evalúen barreras percibidas no solo por los prescriptores sino por todos los actores involucrados en la cadena del medicamento para detectar otros problemas potenciales en materia de acceso.

#### *4) Determinantes de acceso, establecidos o atribuibles a las instituciones y los sistemas de salud*

Esta categoría comprende los esfuerzos que realizan los sistemas de salud de cada país para brindarle a la población atención médica equitativa y de calidad. Al respecto se encontraron dos estudios que compararon los listados de medicamentos esenciales de la OMS contra los diseñados por algunos países, evidenciando situaciones preocupantes. El primero incluyó 75 países de bajos y medianos ingresos, identificando que el 40% de los países de bajo ingreso no consideran como esenciales algunos medicamentos requeridos para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de mama, como es el caso para los tratamientos con sobreexpresión de la proteína de superficie HER2 [15]. El segundo estudio que abordó con datos de 116 países develó una concordancia media para los países de ingresos bajos y medianos del 42,71%, con una asociación entre el Producto Interno Bruto (PIB) per cápita con los gastos en salud, el índice de desarrollo humano y la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad [19].

La oportunidad del tratamiento también fue incluida en esta categoría como tema de interés. El estudio realizado por Piñeros *et al.* [29] analizó una muestra de 1.106 mujeres de Bogotá que recibía tratamiento para cáncer de mama y obtuvo que en promedio, pasaban 91 días (IC95%: 82-97 días) desde la primera consulta médica hasta el diagnóstico y 137 días (IC95%: 127-147 días) para iniciar tratamiento. En contraste, se encontró que aquellas mujeres con mayor nivel educativo, pertenecientes al régimen contributivo de salud, de estratos socioeconómicos altos y aquellas que consultaban

por tamizaje, tardaban menos días en obtener un diagnóstico y un tratamiento para su patología. El resultado anterior fue complementado en un estudio cualitativo en cinco ciudades colombianas que analizó los discursos de mujeres con cáncer de mama, informando que las mujeres de menores recursos económicos, las de bajo nivel educativo y las afiliadas al régimen subsidiado en salud son quienes experimentan un mayor volumen en términos de barreras de acceso [33]. Los mismos autores realizaron otro estudio en 2016, que incluyó 240 mujeres con cáncer de mama, detectando que solo el 17,1% de estas mujeres fueron tratadas a tiempo, al 30,4% le fue negada la prestación de servicios de salud, y que el 31,2% debió acudir a herramientas legales para obtener sus tratamientos [37].

Otro estudio colombiano de tipo retrospectivo que incluyó 806 mujeres con cáncer de mama, reportó dificultades para la obtención y administración del tratamiento y en coherencia con otras investigaciones de la revisión, las mujeres de escasos recursos son las que enfrentan mayores barreras administrativas y sociales a la hora de acceder a tratamientos y servicios en salud para su patología [16], hallazgo que se complementa con los resultados presentados por Cifuentes *et al.* en el que detectaron malas percepciones en los procesos de educación y prevención en pacientes que reciben tratamientos para varios tipos de cáncer [38].

##### 5) *Intervenciones para el aumentar el acceso equitativo a los medicamentos*

Esta categoría comprende las acciones que han realizado diversos actores, en especial la sociedad civil para resolver las barreras en el acceso a medicamentos para cáncer de mama. En este caso, se destaca la investigación hecha por Deprá *et al.* [20], en la que se encontró que la Organizaciones No Gubernamentales (ONG) dedicadas al cáncer de mama en Brasil realizaron alianzas con representantes de los poderes ejecutivo, legislativo y judicial y la industria farmacéutica para ampliar el mercado y aumentar el uso de nuevos medicamentos. Por otro lado, el estudio realizado por Clark *et al.* [17], mostró estrategias gubernamentales realizadas por el *Boston Racial and Ethnic Approaches to Community Health* (REACH), quienes diseñaron intervenciones comunitarias para resolver barreras de acceso como la violencia doméstica, las barreras de comunicación entre pacientes y médicos, el seguimiento adecuado de los casos positivos, entre otros, que fueron exitosos para acceder a programas de detección.

En Inglaterra, el Fondo de Medicamentos contra el Cáncer (30), ONG dedicada a facilitar acceso a tratamientos nuevos y promisorios para esta patología, reportó que el costo del Eribulina Mesilato, no puede ser cubierto por el sistema de salud tradicional y se tienen que implementar políticas de precios estructuradas. Otra alternativa estudiada fue la producción de medicamentos genéricos y biosimilares. Lo anterior fue objeto de estudio por Hill *et al.* [25], quienes establecieron que si se producen

alternativas multifuente y biosimilares para el manejo y tratamiento del cáncer, pueden aumentar la competencia en el mercado y estar disponibles a menores precios que el producto pionero, haciendo factible su disponibilidad en los países en desarrollo y aumentando el ahorro en los países de altos ingresos, como el ahorro estimado para Estados Unidos, que oscila entre un 99,5% y un 99,8% por tratamiento persona-año. Un estudio similar realizado por el mismo investigador para el Reino Unido estableció que la producción de genéricos y biosimilares podría permitir un ahorro parecido al previamente reportado [24].

### **Otras consideraciones**

La falta de acceso a medicamentos, y en especial a los medicamentos esenciales son evidencia de carencias en los sistemas de salud y políticas públicas, por lo que es necesario establecer soluciones que contribuyan a un acceso a medicamentos seguros y efectivos que permitan mejorar la salud de las personas y en el caso particular de cáncer de mama a mejorar su calidad de vida [39].

De esta forma, los resultados de la presente investigación constituyen un aporte para la identificación de factores que influyen negativamente en el acceso a medicamentos para el cáncer de mama. Si bien se detectaron 5 categorías de interés, varios de los autores coincidieron en que la PI, la disponibilidad de medicamentos biosimilares y mejoras en el sistema de salud son temas clave a la hora de abordar el tema de acceso a medicamentos para el cáncer de mama. También se detectó que hay una gran brecha de inequidad en el acceso a los tratamientos para los pacientes con cáncer de mama. Se resaltan elementos como la baja capacidad económica de los pacientes, su bajo nivel educativo, los requerimientos de largos desplazamientos para la obtención y administración de los medicamentos, elementos de discriminación social, el no contar con un trabajo estable y el régimen/modalidad de afiliación al sistema/seguro de salud o la no afiliación a éste. El hecho de que los elementos mencionados constituyan barreras de acceso para el tratamiento debe llamar la atención, en la fuerte relación que existe entre las condiciones sociales y estructurales de las personas y su estado de salud y las posibilidades que tienen para acceder a los servicios de salud y para el caso de este estudio, a recibir un tratamiento efectivo, seguro y oportuno para su patología.

Por otro lado, los resultados del análisis efectuado sugieren que países de bajos y medianos ingresos no estarían preparados para brindar un tratamiento esencial a los pacientes con cáncer de mama, tanto por su baja disponibilidad en el territorio, como por las limitantes de los altos costos de los medicamentos dirigidos para el tratamiento del cáncer de mama y el presupuesto que estos países aportan al mantenimiento de la salud de sus habitantes. Elementos como las patentes, el monopolio farmacéutico, y las difi-

cultades en la inclusión de tecnologías sanitarias en los sistemas de salud han influido fuertemente en este aspecto.

Adicionalmente, existen elementos relacionados con las instituciones de salud y los sistemas de salud en sí que deben ser revisados por las naciones, incluyendo las dificultades en los trámites para acceder a un tratamiento, la falta de coordinación entre instituciones, las coberturas insuficientes de tratamientos en los seguros de salud y la regulación de precios y disponibilidad de medicamentos. Estos factores convergen para dificultar aún más el acceso a un tratamiento en países de bajos y medianos ingresos, donde las brechas de inequidad representan un reto para el cuidado y la salud de las personas.

Estrategias adicionales que podrían implementarse para aumentar el acceso a medicamentos en cáncer de mama podrían estar enfocadas en las salvaguardas de salud pública en materia de PI [40]. Algunas propuestas incluyen la adopción de normativas rigurosas en términos de criterios de patentabilidad, para evitar concesión de monopolios; capacidad de establecer anuencias previas para el trámite de solicitudes de patentes y otros productos farmacéuticos; el uso de importaciones paralelas; asegurarse de que los tratados comerciales y de inversión no incluyan disposiciones que interfieran la obligación de satisfacer el derecho a la salud y, finalmente, conceder licencias obligatorias, las cuales tienen la virtud, comprobada en una veintena de países, de bajar los precios de los medicamentos involucrados [34]. Dichas medidas permitirían una mayor presencia de medicamentos genéricos en el mercado, logrando reducir los precios y así facilitar el acceso a medicamentos esenciales. Una publicación realizada por Farmer *et al.* invita a tomar acción para contrarrestar las inequidades que existen en los índices de supervivencia entre las poblaciones que a la vez tiende a incrementarse con el tiempo, especialmente en los países de bajos y medianos ingresos [22]. El acceso limitado a medicamentos, además de ser un resultado de la inequidad, se comporta también como un reproductor de esta, tal como se observa en su relación con la supervivencia de pacientes con cáncer. Por esto, una meta de acción para los actores dentro de los sistemas de salud, debe ser el mejoramiento del acceso a medicamentos para el tratamiento de esta patología, y a la disminución de la amplia brecha de inequidad que existe frente al tratamiento entre las poblaciones.

Todas estas categorías podrían constituirse en estrategias de acceso que traerían beneficios no solo para los pacientes, sino para el sistema de salud. Esta apreciación coincide con otros autores. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Ledezma-Morales *et al.* [41] realizaron una revisión estructurada de la literatura para identificar estrategias orientadas a favorecer el acceso a medicamentos de interés en salud pública. Dentro de sus análisis establecieron estrategias claves para favorecer el acceso a medicamentos

de interés en salud pública de alto costo o protegidos por patentes, tales como negociaciones centralizadas de precios; el apoyo financiero público para la investigación, desarrollo y producción nacional de medicamentos genéricos; la aplicación de las flexibilidades del acuerdo sobre los PI y la implementación de programas de asistencia, y que estos elementos constituidos de manera estructurada podrían ser benéficos para la salud pública.

## CONCLUSIONES

Siendo el cáncer de mama una patología de tan alto impacto, se deben generar políticas y estrategias tanto nacionales como territoriales para fortalecer el acceso real al tratamiento en la población, y la monitorización de las barreras de acceso que enfrentan las pacientes, especialmente en poblaciones vulnerables. Así, el producto de este trabajo puede propiciar el debate y sentar bases para futuras investigaciones que se pueden integrar en políticas públicas, planes o proyectos que busquen mejorar la salud de las mujeres que padecen de cáncer de mama.

Elementos como los Derechos de Propiedad Intelectual, precios elevados de medicamentos, disponibilidad de medicamentos biosimilares, ubicación socioeconómica de los pacientes, oportunidad en la atención, fallas en el sistema de salud y carencia de alianzas estratégicas parecen elementos determinantes para limitar el acceso a medicamentos de cáncer de mama y que deben ser considerados en la formulación de políticas públicas teniendo como prioridad la salud pública.

Tales políticas deben involucrar, gobierno, academia, profesionales en salud, industria, sociedad civil y organizaciones de pacientes para así abordar todos los actores involucrados. Además, las acciones deben estar enmarcadas teniendo en cuenta condiciones sociales particulares y especialmente, centradas en el paciente para garantizar el derecho a la salud, con equidad y accesibilidad.

Futuras investigaciones podrían estar orientadas en cuantificar el impacto de intervenciones o políticas públicas en el acceso a medicamentos para cáncer de mama y explorar otras patologías de interés para detectar otras barreras de acceso no exploradas en la investigación.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como limitación del estudio es de aclarar que se pudieron omitir referencias no detectadas en los procesos de selección y tamizaje, no obstante, se proponen elemen-

tos y categorías que pueden ser explorados a profundidad en investigaciones futuras haciendo énfasis en ámbitos locales.

## AGRADECIMIENTOS

Se presenta un especial agradecimiento al Instituto de Salud Pública de la Pontificia Universidad Javeriana, a Ángela Acosta y César Moreno de Misión Salud por las contribuciones e ideas para la ejecución de la investigación.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no declaran conflicto de interés

## REFERENCIAS

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, LA. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*, **68**(6), 394-424 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. B.W. Stewart, C.P. Wild (editores), World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, *World Cancer Report 2014*, WHO Press, Lyon, 2014, 632 p. URL: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>, consultado el 23 de enero de 2023.
3. World Health Organization, *Addressing the global shortage of, and access to, medicines and vaccines*, Seventy-first World Health Assembly, 2018. URL: <http://www.unsgaccessmeds.org/final-report>, consultado el 23 de enero de 2023.
4. T.J. Oscanoa, Acceso y usabilidad de medicamentos: propuesta para una definición operacional, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, **29**(1), 119-126 (2012). URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v29n1/a18v29n1.pdf>

5. World Health Organization, *The world medicines situation 2011: Access to essential medicines as part of the right to health*, 3a ed., Geneva, 2011. Disponible en: [http://biofarmaka.ipb.ac.id/biofarmaka/2011/Material%20of%20Workshop%20HerbalNet%20\(World%20Medicine%20Situation%202011\)%20-%20WMS%20ch7%20Access%20to%20Medicine%202011.pdf](http://biofarmaka.ipb.ac.id/biofarmaka/2011/Material%20of%20Workshop%20HerbalNet%20(World%20Medicine%20Situation%202011)%20-%20WMS%20ch7%20Access%20to%20Medicine%202011.pdf), consultado el 5 de marzo de 2021.
6. Instituto Nacional de Cancerología ESE, Instituto Geográfico Agustín Codazzi, *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia*, 4a ed., Vol. 1, Bogotá D.C., 2017, 124 p. URL: <https://www.cancer.gov.co/conozca-sobre-cancer-1/publicaciones/atlas-mortalidad-cancer-colombia-2017>, consultado el 5 de octubre de 2020.
7. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, Cuenta de Alto Costo (CAC), *Situación del cáncer en la población adulta atendida en el SGSSS de Colombia*, Bogotá D.C., 2019.
8. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, Cuenta de Alto Costo (CAC), *Situación del cáncer en la población adulta atendida en el SGSSS de Colombia*, Vol. 91, Bogotá D.C., 2017, p. 399-404.
9. S.A. Arias, Inequidad y cáncer: una revisión conceptual, *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, **27**(3), 341-348 (2009). Doi: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.2060>
10. ECLAC, Economic Commission for Latin America and the Caribbean, *Social Panorama of Latin America, 2018*, United Nations publication, 2019, 221 p. URL: [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/44396/S1900050\\_en.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/44396/S1900050_en.pdf?sequence=4&isAllowed=y), citado el 3 de febrero de 2021.
11. G. Lu, J. Li, Sh. Wang, J. Pu, H. Sun, Zh. Wei, Y. Ma, J. Wang, H. Ma, The fluctuating incidence, improved survival of patients with breast cancer, and disparities by age, race, and socioeconomic status by decade, 1981–2010, *Cancer Manag. Res.*, **10**, 4899-4914 (2018). Doi: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S173099>
12. L.L. Pires de Lemos, M. Carvalho de Souza, D.P. Moreira, P.H.R. Fernandes-Almeida, B. Godman, S. Verguet, A.A. Guerra Junior, M. Leal-Cherchiglia, Stage at diagnosis and stage-specific survival of breast cancer in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis, *PLoS One*, **14**(10), e0224012 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224012>

13. E. de Vries, G. Buitrago, H. Quitian, C. Wiesner, J.S. Castillo, Access to cancer care in Colombia, a middle-income country with universal health coverage, *J. Cancer Policy*, **15**(Part B), 104-112 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2018.01.003>
14. C.H. Barrios, T. Reinert, G. Werutsky, Access to high-cost drugs for advanced breast cancer in Latin America, *Ecancermedicalscience*, **13**, 898 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.898>
15. Y.T. Bazargani, A. de Boer, J.H.M. Schellens, H.G.M. Leufkens, A.K. Mantel-Teeuwisse, Essential medicines for breast cancer in low and middle income countries, *BMC Cancer*, **15**, 591 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1583-4>
16. L.C. de Charry, G. Carrasquilla, S. Roca, Equidad en la detección del cáncer de seno en Colombia, *Revista de Salud Pública*, **10**(4), 571-582 (2008).
17. C.R. Clark, N. Baril, M. Kunicki, N. Johnson, J. Soukup, K. Ferguson, S.t Lipsitz, J. Bigby; REACH 2010 Breast and Cervical Cancer Coalition, Addressing social determinants of health to improve access to early breast cancer detection: Results of the Boston reach 2010 breast and cervical cancer coalition women's health demonstration project, *J. Womens Health (Larchmt)*, **18**(5), 677-690 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1089/jwh.2008.0972>
18. R.E. Cuomo, R.L. Seidman, T.K. Mackey, Country and regional variations in purchase prices for essential cancer medications, *BMC Cancer*, **17**(1), 566 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3553-5>
19. R.E. Cuomo, T.K. Mackey, The availability of essential cancer medication: An analysis of national formularies, *J. Cancer Policy*, **12**, 49-54 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2017.03.010>
20. A.S. Deprá, C.D.M. Ribeiro, I. Maksud, Estratégias de instituições da sociedade civil no acesso a medicamentos para câncer de mama no SUS, *Cad. Saúde Pública*, **31**(7), 1517-1527 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00203413>
21. A.J. Farias, C.Y. Ochoa, G. Toledo, S.-I. Bang, A.S. Hamilton, X.L. Du, Racial/ethnic differences in patient experiences with health care in association with earlier stage at breast cancer diagnosis: Findings from the SEER-CAHPS data, *Cancer Causes and Control*, **31**(1), 13-23 (2020).



22. P. Farmer, J. Frenk, F.M. Knaul, L.N. Shulman, G. Alleyne, L. Armstrong, *et al.*, Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: A call to action, *The Lancet*, **376**(9747), 1186-1193 (2010). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61152-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61152-X)
23. Fix the Patent Laws Campaign, *Patent barriers to medicine access in South Africa: A case for patent law reform*, 2016. URL: [https://msfaccess.org/sites/default/files/ACCES\\_report\\_FTPL\\_ENG\\_2016.pdf](https://msfaccess.org/sites/default/files/ACCES_report_FTPL_ENG_2016.pdf), consultado el 10 de junio de 2020.
24. A. Hill, C. Redd, D. Gotham, I. Erbacher, J. Meldrum, R. Harada, Estimated generic prices of cancer medicines deemed cost-ineffective in England: A cost estimation analysis, *BMJ Open*, **7**(1), e011965 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011965>
25. A. Hill, D. Gotham, J. Fortunak, J. Meldrum, I. Erbacher, M. Martin, *et al.*, Target prices for mass production of tyrosine kinase inhibitors for global cancer treatment, *BMJ Open*, **6**(1), e009586 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009586>
26. P. Lammers, C. Criscitiello, G. Curigliano, I. Jacobs, Barriers to the use of trastuzumab for HER2+ breast cancer and the potential impact of biosimilars: A physician survey in the United States and emerging markets, *Pharmaceuticals (Basel)*, **7**(9), 943-953 (2014). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph7090943>
27. B.J. Monk, P.E. Lammers, T. Cartwright, I. Jacobs, Barriers to the access of bevacizumab in patients with solid tumors and the potential impact of biosimilars: A physician survey, *Pharmaceuticals (Basel)*, **10**(1), 19 (2017). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph10010019>
28. I.L. Okoronkwo, P. Ejike-Okoye, A.U. Chinweuba, A.C. Nwaneri, Financial barriers to utilization of screening and treatment services for breast cancer: An equity analysis in Nigeria, *Niger. J. Clin. Pract.*, **18**(2), 287-291 (2015). Doi: <https://doi.org/10.4103/1119-3077.151070>
29. M. Piñeros, R. Sánchez, F. Perry, O.A. García, R. Ocampo, R. Cendales, Demoras en el diagnóstico y tratamiento de mujeres con cáncer de mama en Bogotá, Colombia, *Salud Pública de México*, **53**(6), 478-485 (2011).
30. R. Ramaswami, S.M. O’Cathail, J.H. Brindley, P. Silcocks, S. Mahmoud, C. Palmieri, Activity of eribulin mesylate in heavily pretreated breast cancer granted access via the Cancer Drugs Fund, *Future Oncol.*, **10**(3), 363-376 (2014).

31. L. Ramjan, A. Cotton, M. Algosó, K. Peters, Barriers to breast and cervical cancer screening for women with physical disability: A review, *Women Health*, **56**(2), 141-156 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1080/03630242.2015.1086463>
32. J.H. Restrepo-Zea, C. Silva-Maya, F. Andrade-Rivas, R. VH-Dover, Acceso a servicios de salud: análisis de barreras y estrategias en el caso de Medellín, Colombia, *Revista Gerencia y Políticas de Salud*, **13**(27), 242-265 (2014). Doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.rgyps13-27.assa>
33. G. Sánchez, C. Laza, C. Estupiñán, L. Estupiñán, Barreras de acceso a los servicios de salud: narrativas de mujeres con cáncer de mama en Colombia, *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, **32**(3), 305-313 (2014).
34. M. Machado-Beltrán, H. Núñez-Rocha, Á. Acosta, Análisis de la normatividad de países suramericanos relacionada con los derechos de propiedad intelectual aplicables a medicamentos. *La Propiedad Inmaterial*, **28**, 5-42 (2019). Doi: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3519520>
35. C.A. Conde-Gutiérrez, L.F. Herrera-Sierra, La estandarización internacional de las patentes y sus efectos en el acceso a medicamentos, en: E. Rengifo-García (editor), *Derecho de Patentes*, Colombia: Universidad Externado de Colombia, Bogotá D.C., 2017, p. 107-138.
36. B. Tenni, H.V.J. Moir, B. Townsend, B. Kilic, A.-M. Farrell, T. Keegel, D. Gleeson, What is the impact of intellectual property rules on access to medicines? A systematic review, *Globalization and Health*, **18**, 40 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12992-022-00826-4>
37. G. Sánchez, C.G. Niño, A.C. Estupiñán, Determinantes del tratamiento oportuno en mujeres con cáncer de mama apoyadas por seis organizaciones no gubernamentales en Colombia, *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, **34**(3), 297-305 (2016). Doi: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n3a04>
38. L.C. Cifuentes-Salinas, N. Duque-Zapata, S.A. Rodríguez-Garzón, Percepción sobre la ruta de atención en salud de cáncer en pacientes de Envigado, 2020-2021. *Revista Colombiana de Hematología y Oncología*, **9**(2), 92-106 (2022). Doi: <https://orcid.org/0000-0002-4861-9086>
39. World Health Organization, *The selection and use of essential medicines: Report of the WHO Expert Committee*, 2017, Geneva, 2017. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259481>, consultado el 26 de junio de 2023.

40. M.A. Machado-Beltrán, *Representaciones sociales del medicamento genérico en pacientes adultos polimedicados de Bogotá*, Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 2021.
41. M. Ledezma-Morales, P. Amariles, C.M. Vargas-Peláez, F.A. Rossi-Buenaventura, Estrategias para promover el acceso a medicamentos de interés en salud pública: revisión estructurada de la literatura, *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, **38**(1), 1-14 (2020). Doi: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e332273>

### COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R.E. Peñaloza-Quintero, M.A. Machado-Beltrán, C. Agudelo-Orozco, Y.T. Hernández-Sandoval, M.A. Matallana-Gomez, A.M. Zapata-Matheus, L.V. Peña-Peña, A.C. Reyes-Rojas, J.F. Venegas, J. Bueno-Rocha, Acceso a medicamentos en pacientes con cáncer de mama: una revisión narrativa de la literatura, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 994-1020 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110752>

# Analysis of phytochemical composition, antioxidant activity, and $\beta$ -glucuronidase inhibition potential of *Arisaema tortuosum* leaf extract

Rajni Garg<sup>1</sup>, Rajat Sharma<sup>2</sup>, Diksha Puria<sup>3</sup>, Nnabuk Okon Eddy<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Sciences, Galgotias College of Engineering & Technology, Greater Noida, Uttar Pradesh 201310, India. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9629-8141>, E-mail: [rajnigarg@science.org.in](mailto:rajnigarg@science.org.in)

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Rayat Bahra University, Mohali, Punjab, 140301, India. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9629-8141>, E-mail: [rajatkahol@gmail.com](mailto:rajatkahol@gmail.com)

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Rayat Bahra University, Mohali, Punjab, 140301, India. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4394-440X>, E-mail: [dikshapuria3946@gmail.com](mailto:dikshapuria3946@gmail.com)

<sup>4</sup>Department of Pure and Industrial Chemistry, University of Nigeria, Nsukka, Enugu State, Nigeria. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7704-3082>, E-mail: [okon.nnabuk@unn.edu.ng](mailto:okon.nnabuk@unn.edu.ng)

\*Correspondence author

Received: January 18, 2023

Corrected: March 23, 2023

Accepted: July 30, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** Medicinal plants contain essential phytochemicals and are used in traditional herbal therapy for ages. These phytochemicals are bioactive compounds and possess significant antibacterial and antifungal properties in addition to more biologically important potentials. The important bioactive phytochemicals include polyphenolic compounds and flavonoids. *Arisaema tortuosum* has been reported as a medicinal plant in literature and is used in treating many health issues. **Aim:** To investigate the phytochemical composition, total polyphenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), antioxidant capacity, and  $\beta$ -glucuronidase inhibition potential of the extract obtained from leaves of *A. tortuosum*. **Methods:** The phytochemical composition, TPC, TFC, and antioxidant capacity of the extract was analysed.  $\beta$ -glucuronidase inhibition assay was used to determine  $\beta$ -glucuronidase inhibition potential. The dose-dependent data was used to determine  $IC_{50}$  value of the extract. **Results:** The gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) analysis identified the fifty-three components from the leaf extract that was observed to possess a significant volume of TPC and TFC. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

(DPPH) assay revealed a  $IC_{50}$  value of 936  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indicating a high antioxidant activity of the extract. **Conclusion:** The study revealed the presence of many biologically important phytochemicals and a rich number of total polyphenols and flavonoids in leaf extract of *A. tortuosum* signifying the potential biomedical applications.

**Keywords:** *Arisaema tortuosum*, antioxidant activity, anti-inflammatory potential, total flavonoid content, total polyphenolic content.

## RESUMEN

### Análisis de la composición fitoquímica, actividad antioxidante y potencial de inhibición de la $\beta$ -glucuronidasa del extracto de hoja de *Arisaema tortuosum*

**Introducción:** las plantas medicinales contienen compuestos fitoquímicos esenciales y se utilizan en la terapia herbolaria tradicional desde hace siglos. Estos fitoquímicos son compuestos bioactivos y poseen importantes propiedades antibacterianas y antifúngicas, además de potenciales efectos biológicamente más importantes. Los fitoquímicos bioactivos importantes incluyen compuestos polifenólicos y flavonoides. En la literatura se ha reportado a la *Arisaema tortuosum* como una planta medicinal y que se usa para tratar muchos problemas de salud. **Objetivo:** investigar la composición fitoquímica, el contenido polifenólico total (TPC), el contenido total de flavonoides (TFC), la capacidad antioxidante y el potencial de inhibición de la  $\beta$ -glucuronidasa del extracto obtenido de las hojas de *A. tortuosum*. **Métodos:** se analizó la composición fitoquímica, TPC, TFC y la capacidad antioxidante del extracto. Se utilizó el ensayo de inhibición de  $\beta$ -glucuronidasa para determinar el potencial de inhibición de este agente. Los datos dependientes de la dosis se usaron para determinar el valor  $IC_{50}$  del extracto. **Resultados:** el análisis de cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS) permitió identificar cincuenta y tres componentes del extracto de hojas, que se observó que poseían un volumen significativo de TPC y TFC. El ensayo de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) reveló un valor  $IC_{50}$  de 936  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que indica una alta actividad antioxidante del extracto. **Conclusión:** este estudio reveló la presencia de muchos compuestos fitoquímicos biológicamente importantes y una gran cantidad de polifenoles totales y flavonoides en el extracto de hoja de *A. tortuosum*, lo que significa aplicaciones biomédicas potenciales.

**Palabras clave:** *Arisaema tortuosum*, actividad antioxidante, potencial antiinflamatorio, contenido total de flavonoides, contenido de polifenoles totales.

## RESUMO

### Análise da composição fitoquímica, atividade antioxidante e potencial de inibição da $\beta$ -glucuronidase do extrato da folha de *Arisaema tortuosum*

**Introdução:** as plantas medicinais contêm compostos fitoquímicos essenciais e têm sido utilizadas na terapia tradicional à base de plantas há séculos. Esses fitoquímicos são compostos bioativos e possuem importantes propriedades antibacterianas e antifúngicas, além de efeitos potencialmente mais importantes biologicamente. Fitoquímicos bioativos importantes incluem compostos polifenólicos e flavonóides. *Arisaema tortuosum* tem sido relatada na literatura como planta medicinal e utilizada para o tratamento de diversos problemas de saúde. **Objetivo:** investigar a composição fitoquímica, teor de polifenóis totais (TPC), teor de flavonoides totais (TFC), capacidade antioxidante e potencial de inibição da  $\beta$ -glucuronidase do extrato obtido das folhas de *A. tortuosum*. **Métodos:** foram analisados a composição fitoquímica, TPC, TFC e a capacidade antioxidante do extrato. O ensaio de inibição da  $\beta$ -glucuronidase foi utilizado para determinar o potencial de inibição deste agente. Os dados dependentes da dose foram usados para determinar o valor  $IC_{50}$  do extrato. **Resultados:** a análise por cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS) permitiu a identificação de cinquenta e três componentes do extrato da folha, que apresentaram um volume significativo de TPC e TFC. O ensaio de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) revelou um valor de  $IC_{50}$  de 936  $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma alta atividade antioxidante do extrato. **Conclusão:** este estudo revelou a presença de muitos compostos fitoquímicos biologicamente importantes e uma grande quantidade de polifenóis totais e flavonóides no extrato da folha de *A. tortuosum*, significando potenciais aplicações biomédicas.

**Palavras-chave:** *Arisaema tortuosum*, atividade antioxidante, potencial anti-inflamatório, teor total de flavonoides, teor total de polifenóis.

## INTRODUCTION

Medicinal plants have remarkable importance in traditional Ayurveda and Unani treatments because of their significant biological activities including antibacterial, antioxidant, and anti-cancer potential [1]. Scientists have analyzed various phytochemicals present in various parts of medicinal plants including leaves, stem, root, and fruits for their antioxidant and antibacterial potential [2]. Many phytochemicals such as phe-

nolic compounds, proteins, flavonoids, and terpenoids have been found to possess significant biological potential and hence these can be used as therapeutic agents in health care [3]. Along with their potent antioxidant action, flavonoids and phenolic compounds have also been identified as anti-inflammatory agents [4]. The different inflammation-related enzymes may be targeted by a collection of phenolic compounds that includes proteolytic enzymes of neutrophils [5]. Additionally, the effects of anti-inflammation may come from a synergistic action of scavenging radicals and interactions with enzymes of inflammation [6]. Hence, there is a continuous search to explore phytochemicals in medicinally important plants [7].

*Arisaema tortuosum* belonging to subfamily Aroideae relates to the herbaceous Araceae family and is popularly referred to as “Cobra or Whipcord lily”. Various species of genus *Arisaema* are widely distributed throughout the world especially in the Himalayan region and have been explored for their biological potential [8]. The essential oil obtained from *A. fargesii* has been found to have a great inhibitory impact on the development of *Aedes* mosquito larvae and hence it is utilized to control *Aedes* mosquito hatchlings to forestall the spread of dengue fever [9]. The methanolic extract of the *A. utile* rhizomes has been found to exhibit significant cytotoxic activity against cancer and antioxidant activity [10]. The essential oil obtained from *A. lobatum* and *A. franchetianum* has been found to have the anthelmintic effect against *Haemonchus contortus* [11]. The Methanolic root extract of *A. jacquemontii* displayed antibacterial action against *Fusarium oxysporum* [12].

*A. tortuosum* is another medicinally important species of genus *Arisaema* as its various parts are utilized for the treatment of many contagious and bacterial diseases [5]. It is also utilized to check the noxious effect of snakebite and hair follicle infection in addition to its use for recuperation of cracked bones and as antinematodal [13]. The leaves of *A. tortuosum* are utilized to treat stomachache and rheumatism [14]. It has also been found to exhibit cyto-toxic activity against human cancer cells [15]. These biological activities like antifungal, antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer properties have been attributed to the presence of various metabolites and phytochemical compounds like alkaloids, polyphenols, terpenoids, glycosides, saponins, amino acids, lactones, and flavonoids, etc. [10]. Thus, it is very important to ascertain the phytochemical composition and recognize the medicinally important plants.

However, there is no study available in the literature on the phytochemical analysis of leaf extract of *A. tortuosum*, to the best of our knowledge. Consequently, the purpose of this research was to offer a scientific knowledge of its phytochemical composition, as well as support for its ethnomedicinal use in the treatment of different illnesses. The study has been directed to analyze the different volatile organic components of the

extract obtained from leaves of *A. tortuosum*. The study also explores the antioxidant as well as the  $\beta$ -glucuronidase inhibition potential of the extract of this medicinally important plant.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation and Characterization of Extract

The collection of the plant was carried out from the Himalayan region of Dharamshala (Naddi), Himachal Pradesh, India and identification was carried out at the University school of Agricultural Sciences (RBU, Chandigarh) under voucher with Ref. No. RBU/USAS/HOD/22/190. Young and healthy leaves of *A. tortuosum* were selected and firstly cleaned by washing with tap water and afterward with demineralized water to expel the residue and dust particles over their surface. After draining free water, the material was dried under the shade at the room temperature for 30 days and ground to obtain the powdered form. 100 g of the powdered sample was processed for 12 hrs. By the Soxhlet extraction process utilizing 300 mL of methanol as a solvent at its boiling point [16]. The solvent was removed from the extract by using a rotary vacuum evaporator. The obtained final product was characterized by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) analysis (Model THERMO Scientific Trace 1300GC) using the capillary column (Model, Restek USA RTx-5Sil MS) with dimensions of 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 mm. Helium was delivered at a flow rate of 1 mL/min. as a carrier at a split ratio of 1:5. The mass spectra were acquired utilising the electron ionisation (EI) mode with an energy of 70 electron volts (eV) at a spectral range (m/z) of 40-700. The experimental setup involved setting the interface temperature to 280 °C and the ion source temperature to 200 °C. The identification of different constituents was conducted through the comparison of their retention time and mass spectral data with the Wiley8 and NIST11 library spectral database. The quantification of the compounds was performed by analysing the area under the peak, and the resulting data was expressed as a percentage. The analysis of each sample was conducted in triplicate.

### Total Phenolic Content

The Folin-Ciocalteu spectrophotometric method was used for the quantitative determination of the total phenolic content of the extract as described by Rebaya *et al.* [17]. 1 mL of extract (1 mg/mL) or standard gallic acid solution (30-150 mg/L) was diluted up to 10 mL by adding deionized water followed by addition of Folin-Ciocalteu reagent solution (1 mL). After the addition of 2 mL of sodium carbonate solution, 20% (w/v), the mixture was kept in dark for 60 min. and the absorbance was measured



at 750 nm (UV-Visible spectrophotometer, Agilent Cary 60). The calibration curve provided the estimate of the total phenolic content (mg of gallic acid equivalent per g of dry extract weight).

### Total Flavonoid Content

Aluminum chloride colorimetric technique was used to assess the TFC present in the extract as outlined by Stoyanova *et al.* [18]. 1 mL of extract (1 mg/mL) or standard Rutin trihydrate solution (60-300 mg/L) was diluted up to 5 mL by adding deionized water. After adding 0.3 mL of NaNO<sub>2</sub> solution, 5% (w/v), the mixture was left untouched for 5 min. In this mixture, 0.3 mL of AlCl<sub>3</sub> solution, 10% (w/v) and 2 mL of 1 M NaOH were added followed by dilution to 10 mL with deionized water. The mixture was again kept in dark for 30 minutes at 25 °C and the absorbance at 510 nm was recorded (UV-Visible spectrophotometer, Agilent Cary 60). The total flavonoid content (mg of rutin trihydrate equivalent per g of dry extract weight) was estimated from the calibration curve.

### Antioxidant potential (DPPH Assay)

The antioxidant potential of the extract was quantitatively determined as free radical scavenging assay by using the DPPH method as given by Garcia *et al.* [19]. 3 mL of fresh DPPH solution (0.1 mM) was poured into 0.2 mL of extract (1 mg/mL) and kept in dark for 30 minutes. The absorbance was recorded by Agilent Cary 60 UV-Visible spectrophotometer at 517 nm. The scavenging impact of the extract against DPPH free radical was determined using Ascorbic acid as a standard on the basis of the equation given below.

$$\% \text{ scavenging effect} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Where  $A_{\text{test}}$  and  $A_{\text{control}}$  are the absorbances of test sample/ standard solution and control respectively.

### Anti-inflammatory Potential ( $\beta$ -glucuronidase inhibition assay)

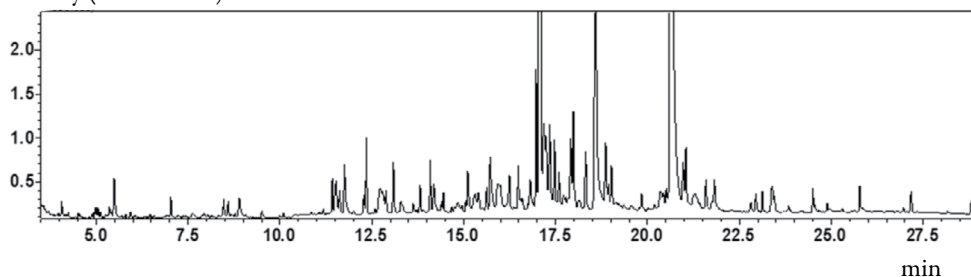
As per the method given by Otang-Mteng *et al.* [1], 0.1 mL of the extract, with varying dosage from 25-100 mg/mL, was preincubated for 5 min. in 0.1 M acetate buffer (pH 7.4) at 37 °C [1]. This mixture was further kept in dark for 30 min. after addition of 0.1 mL  $\beta$ -glucuronidase solution and 2 mL of NaOH (0.5 N) was added to terminate the reaction. A reference, Salicylic acid, was utilized with a concentration of 1 mM and the absorbance of the solution was recorded at 410 nm (UV-Visible spectrophotometer, Agilent Cary 60).

## RESULTS AND DISCUSSION

### GC-MS analysis

Figure 1 illustrates the existence of various secondary metabolites or phytochemicals in the GC-MS profile of the extract. A total of fifty-three phytochemicals were detected in the chromatograph of the methanolic leaf extract of *A. tortuosum* as shown in Table 1. Nonane was eluted first with a retention time of 4.064 min. in the leaf extract. The major peak area was obtained for 6, 10, 14-trimethyl-2-pentadecanone as 54.55% and phytol as 18.86% in the leaf extract. The other identified major phytochemicals included 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-, Phytol, Benzene, 1,3-dimethyl-, 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-, Cyclohexane, (2-methylpropyl)-, Cyclohexane, 1-methyl-2-propyl-, Cyclohexane, butyl-, Naphthalene, decahydro-, trans-, Undecane and hexadecamethyl cyclooctasiloxane. The results confirmed the presence of important bioactive compounds like terpenoids, polyphenols, hydrocarbons and organosiloxanes in the leaf extract of *A. tortuosum*. Some of these phytochemicals with significant biopotential have been listed in Table 2.

Intensity (x 1.000.000)



**Figure 1.** GC-MS analysis of leaf extract of *A. tortuosum*.

### Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content is the quantitative approach to determine the amount of polyphenols present in the plant. Phenols are one of the important plant constituents as the radical scavenging ability depends on the hydroxyl group [12]. The phenolic groups are secondary metabolites and have redox properties that allow them to function as a radical scavenger in various natural activities such as antioxidant, antibacterial and antifungal [20]. The total phenolic content also depends upon the nature of the extraction method and solvent used. The quantity of phenolic content available in methanolic leaf extract of *A. tortuosum* was calculated from a calibration curve. The

TPC for leaf extract of *A. tortuosum* was found as 171.05 gallic acid equivalents/g. The high phenolic content of the plant extract has been correlated with the high antioxidant activity of the medicinal plants in various reports [21, 22].

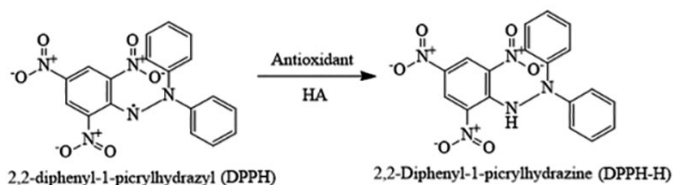
### Total Flavonoid Content (TFC)

Flavonoids such as flavanols and flavones are secondary plant metabolites that are more soluble in polar solvents as compared to the nonpolar solvent, due to this methanol extract has higher flavonoid content as compared to the other extract [17]. These metabolites are responsible for the color as well as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity of plants. The antioxidant activity of the extract is also found to be dependent upon the quantity and position of hydroxyl groups in the flavonoids. The amount of flavonoid present in the leaf extract of *A. tortuosum* was also measured by the regression calibration curve. TFC for the leaf extract was found as 183.5 rutin trihydride equivalents/g. A similar result was reported previously in the case of tuber extract of *A. tortuosum* [5].

### Antioxidant Assay

The polyphenolic compounds present in medicinal plants are referred to as antioxidant agents and used as radical scavengers or metal chelators [16]. The antioxidant effect of the plant depends on phytochemicals present as both major and minor constituents that play an effective role in DPPH radical activity. Literature reports different methods for evaluating the antioxidant activity dependent upon free radical scavenging activity having different mechanisms [23-25].

The general mechanism given for DPPH activity has been illustrated in Figure 2 [25]. In this examination, the leaf extract of *A. tortuosum* was found to exhibit significant DPPH scavenging activity with  $IC_{50}$  value as 936  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results have been found consistent with similar studies carried out on the tuber extract of *A. tortuosum* with scavenging activity against stable DPPH radical having  $IC_{50}$  value of 852  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [5].



**Figure 2.** Illustrative mechanism for DPPH scavenging activity.

**Table 1.** GC-MS analysis of the leaf extract of *A. tortuosum*

Peak#	R. Time	Name	Mol. Formula	Mol. Weight	Compound Nature
1	4.064	Nonane	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	128.259	Linear alkane hydrocarbon
2	17.341	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.348	Phthalic anhydride
3	24.547	1,2-Propanediol, 3-benzyloxy-1,2-diacetyl-	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	266.293	Organic compound
4	8.894	1-Butanone, 1-cyclohexyl-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.253	Organic compound
5	15.108	1-Decanol, 2-hexyl-	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	242.447	Branched alcohol
6	19.02	1-Decanol, 2-octyl-	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	270.501	Organic compound
7	12.723	1-Dodecanol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	186.34	Organic compound
8	15.934	1-Dodecanol, 3,7,11-trimethyl-	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O	228.42	sesquiterpenoids
9	8.471	1-Dodecene	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168.319	Unsaturated aliphatic hydrocarbon
10	16.483	1-Heptadecene	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	198.35	Organic compound
11	17.983	1-Hexacosene	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub>	364.702	Unsaturated aliphatic hydrocarbons
12	23.84	1-Nonadecene	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub>	266.513	Unsaturated aliphatic hydrocarbon
13	14.088	1-Pentadecene	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub>	210.405	Unsaturated aliphatic hydrocarbon
14	11.426	1-Tridecene	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub>	182.351	Unsaturated aliphatic hydrocarbon
15	13.63	2-(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	180.247	Volatile terpenes
16	20.513	2-Cyclohexen-1-ol, 3-methyl-6-(1-methylethyl)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.2493	Organic compound
17	22.945	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	222.28	Organic compound
18	15.398	2-methyltetracosane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212.421	Acyclic branched hydrocarbon
19	17.072	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268.485	Saturated terpenoid alkane
20	11.626	2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	198.35	Chemical compound

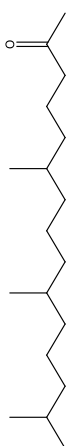

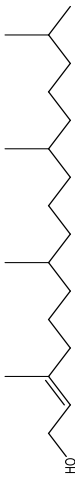
(Continued)

Peak#	R. Time	Name	Mol. Formula	Mol. Weight	Compound Nature
21	16.97	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	Terpene alcohol
22	23.39	3-methyl-5-(2,6-dimethylheptyl)-1,5-Pent-2-en	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238.371	Organic compound
23	23.451	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	324.5	Terpene
24	12.283	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	194.3132	Volatile flavor compound
25	17.591	Benzene, 1-(dodecyloxy)-2-nitro-	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	307.434	Organic compound
26	18.862	Chlorpyrifos	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> C <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	305.57	Organothiophosphate
27	16.245	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	C <sub>12</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> Si <sub>6</sub>	444.924	Organo silicon compound
28	19.837	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	C <sub>16</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub> Si <sub>9</sub>	667.386	Organosiloxane compound
29	21.588	Benzene, 1,3-dimethyl-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106.167	Aromatic compound
30	23.127	Naphthalene, decahydro-, trans-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	138.254	Aromatic compound
31	24.499	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116.16	Beta-hydroxyketones
32	25.773	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	C <sub>16</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub> Si <sub>9</sub>	667.386	Organosiloxane compound
33	27.17	Cyclohexane, 1-methyl-2-propyl-	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub>	154.297	Hydrocarbon compound
34	28.814	Cyclohexane, butyl-	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	140.27	Monocyclic hydrocarbon
35	14.451	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	C <sub>16</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub> Si <sub>8</sub>	593.232	Macrocyclicorganosiloxane
36	20.967	Cyclopentanone, 2-(5-oxohexyl)-	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	182.263	Organic compound
37	14.185	Diethyl Phthalate	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222.24	Benzoic acid ester
38	25.294	Diisooctyl phthalate	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.564	Organic compound
39	11.755	Diphenyl ether	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	170.211	Organic compound
40	8.591	Dodecane	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168.319	Unsaturated aliphatic hydrocarbon
41	24.887	Eicosane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282.556	Unbranched hydrocarbon
42	15.72	Ethanol, 2-(tetradecyloxy)-	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	258.446	Organic compound
43	22.815	Heneicosane	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296.583	Acyclic alkanes
44	12.352	Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226.448	Saturated aliphatic hydrocarbon
45	18.317	Isophytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296.539	Diterpene alcohol

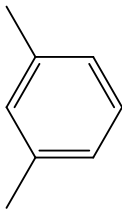
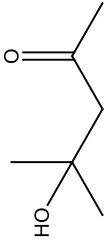
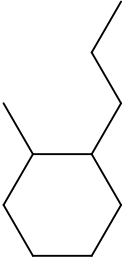
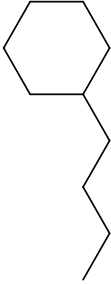
(Continued)

Peak#	R. Time	Name	Mol. Formula	Mol. Weight	Compound Nature
46	5.488	Mesitylene	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub>	120.19	Benzene derivative
47	13.289	Methanone, dicyclohexyl-	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	194.3132	Volatile flavor compound
48	18.588	n-Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	Palmitic acid
49	13.086	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206.32	Organic compound
50	13.814	Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296.539	Diterpene alcohol
51	21.821	Phytol, acetate	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	338.576	Acyclic diterpenoids
52	15.626	Tetradecanal	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O	212.377	Fatty aldehyde
53	7.033	Undecane	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156.313	Hydrocarbon compound

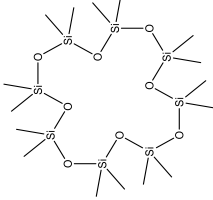
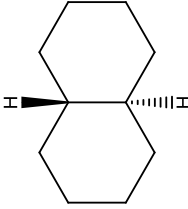
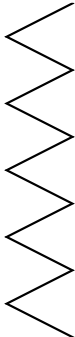
**Table 2.** Structure and activities of major phytochemicals reported in GC-MS analysis

S. No.	Compound Name	Structure	Area %	Activity
1	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-		54.55	Antibacterial agent, cosmetics, antiperspirant
2	n-Hexadecanoic acid		5.44	Antifibrinolytic, Hemolytic, lubricant, Nematicide, and Antiallopecic
3	Phytol		18.86	Anti-inflammatory, antioxidant activity, anticancer and antimicrobial agent

(Continued)

S. No.	Compound Name	Structure	Area %	Activity
1	Benzene, 1,3-dimethyl-		39.54	Antiabortive and antitussive agent
2	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-		87.7	Corrosion inhibitor, anti-scaling, and plating agent
4	Cyclohexane, 1-methyl-2-propyl-		5.48	Antiviral, antiabortive, antipyretic, and anti-inflammatory
5	Cyclohexane, butyl-		3.11	Antiabortive agent, impotence, Antipsoriatic and Antipruritic agent

*(Continued)*

S. No.	Compound Name	Structure	Area %	Activity
6	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-		2.28	Antibacterial agent
7	Naphthalene, decahydro-, trans-		5.11	Anti-spasmodic, antitussive, antiseborrheic, and antiasthmatic agent
8	Undecane		6.41	Antitussive, antiasthmatic, antipruritic and anti-acne agent



### **$\beta$ -Glucuronidase inhibition potential**

$\beta$ -glucuronidase, an enzyme found in neutrophil lysosomal membranes, has been identified as one of the mediators of the inflammatory response [5]. Hence, the anti-inflammatory potential of leaf extract was determined in terms of  $\beta$ -glucuronidase inhibition. A substantial inhibitory action against the  $\beta$ -glucuronidase enzyme in a concentration-dependent manner was observed, with the highest inhibition observed at a concentration of 100 mg/mL in comparison to the control (salicylic acid). 82.36% inhibition was observed for the extract (IC<sub>50</sub> value as 37.45 mg/mL) as compared to the 72.81% inhibition by the control. Thus, *A. tortuosum* leaf extract exhibited a greater ability to inhibit  $\beta$ -glucuronidase activity than an established anti-inflammatory agent, salicylic acid [26].

## CONCLUSION

In this study, the analysis of GC-MS has identified fifty-three bioactive compounds including mainly phytol, terpenoids, and siloxanes, from the leaf parts of *A. tortuosum*. The presence of diverse bioactive compounds justifies that this plant can be used for treating various ailments. The extract exhibited significant availability of high content of total polyphenols and flavonoids and possessed significant antioxidant and  $\beta$ -glucuronidase inhibition activity. Therefore, this plant can be used for many biomedical applications. But, isolating specific phytochemical constituents and confining their biological activity will provide beneficial outcomes. Further studies are however needed to ensure its profile of bioactivity for potential biomedical applications.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors report no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization and software: Rajni Garg.

Writing - original draft: Rajat Kahol.

Data curation: Diksha Puria.

Validation: Nnabuk Okon Eddy.

Writing - review & editing: Rajni Garg and Nnabuk Okon Eddy.

## REFERENCES

1. W. Otang-Mbeng, I.J. Sagbo, Cytotoxic, cellular antioxidant, and antiglucuronidase properties of the ethanol leaf extract from *Bulbine asphodeloides*, *Sci. World J.*, **2021**, 6622318 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/6622318>
2. A. Ceesay, M. Nor Shamsudin, M. Aliyu-Paiko, I.S. Ismail, M.F. Nazarudin, N.M. Alipiah, Extraction and characterization of organ components of the Malaysian Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* yielded bioactives exhibiting diverse properties, *Biomed Res. Int.*, **2019**, 2640684 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1155/2019/2640684>
3. O.S. Etori, J.D. Nwineewii, I.B. Nwoke, Metals and phytochemical composition of leaves and peels of Pawpaw (*Carica Papaya*) sold within Port Harcourt, Rivers State, Nigeria, *Pharmacophore*, **10**(4), 57-61 (2019).
4. G.R.P.I. Abeysiri, R.M. Dharmadasa, D.C. Abeysinghe, K. Samarasinghe, Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache, *Ind. Crops Prod.*, **50**, 852-856 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.043>
5. S.H. Nile, S.W. Park, HPTLC analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of *Arisaema tortuosum* tuber extract, *Pharm. Biol.*, **52**(2), 221-227 (2014). Doi: <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.831110>
6. A.K. Martial-Didier, K.K. Hubert, K.E.J. Parfait, T. Kablan, Phytochemical properties and proximate composition of Papaya (*Carica papaya* L. var solo 8) peels, *Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol.*, **5**(6), 676-680 (2017). Doi: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i6.676-680.1154>
7. M.S. Nagano, C. Batalini, Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 29-47 (2021). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcci-quifa.v50n1.95447>
8. H. Verma, V.K. Lal, K.K. Pant, N. Soni, A ethnomedicinal review on *Arisaema tortuosum*, *Int. J. Adv. Pharmacy, Biol. Chem.*, **1**(2), 176-179 (2012).

9. M. Jia, Q. He, W. Wang, J. Dai, L. Zhu, Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), *Vet. Parasitol.*, **261**, 59-66 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.006>
10. S. Mubashir, W.A. Shah, Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of *Arisaema utile*, *J. Pharm. Res.*, **5**(3), 1368-1370 (2012).
11. L. Zhu, J. Dai, L. Yang, J. Qiu, Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*, *J. Ethnopharmacol.*, **148**(1), 311-316 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.034>
12. S.A. Baba, S.A. Malik, Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume, *J. Taibah Univ. Sci.*, **9**(4), 449-454 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
13. S. Swarnkar, S.S. Katewa, Ethnobotanical observation on tuberous plants from tribal area of Rajasthan (India), *Ethnobot. Leaflet.*, **12**, 647-666 (2008).
14. F. Hussain, S.M. Shah, H. Sher, Traditional resource evaluation of some plants of Mastuj, District Chitral, Pakistan, *Pakistan J. Bot.*, **39**(2), 339-354 (2007).
15. V. Dhuna, J.S. Bains, S.S. Kamboj, J. Singh, Shamugavel, A.K. Saxena, Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having *in-vitro* anticancer activity against human cancer cell lines, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **38**(5), 526-532 (2005). Doi: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.5.526>
16. A. Sharma, D.S. Cannoo, A comparative study of effects of extraction solvents/techniques on percentage yield, polyphenolic composition, and antioxidant potential of various extracts obtained from stems of *Nepeta leucophylla*: RP-HPLC-DAD assessment of its polyphenolic constituents, *J. Food Biochem.*, **41**(2), e12337 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12337>
17. A. Rebaya, S.I. Belghith, B. Baghdikian, V.M. Leddet, F. Mabrouki, E. Olivier, J.K. Cherif, M.T. Ayadi, Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae), *J. Appl. Pharm. Sci.*, **5**(1), 052-057 (2015). Doi: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50110>

18. I. Stoilova, A. Krastanov, A. Stoyanova, P. Denev, S. Gargova, Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*), *Food Chem.*, **102**(3), 764–770 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.023>
19. E.J. Garcia, T.L. Cadorin-Oldoni, S.M. de Alencar, A. Reis, A.D. Loguercio, R.H. Miranda-Grande, Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth, *Braz. Dent. J.*, **23**(1), 22-27 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-64402012000100004>
20. M.A. Soobrattee, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma, T. Bahorun, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **579**(1–2), 200-213 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
21. W. Sun, M.H. Shahrajabian, M. Lin, Research progress of fermented functional foods and protein factory-microbial fermentation technology, *Fermentation*, **8**(12), 688 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation8120688>
22. M.A.R. Mia, Q.U. Ahmed, A.B.M. Helaluddin, S. Ferdosh, M.M. Siddique, S.N.H. Azmi, J. Ahmed, M.Z.I. Sarker, Acute and subacute toxicity assessment of liquid CO<sub>2</sub> extract of *Phaleria macrocarpa* fruits flesh in mice model, *J. King Saud Univ. - Sci.*, **34**(4), 101912 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101912>
23. M. Hosny, M. Fawzy, Y.A. El-Badry, E.E. Hussein, A.S. Eltaweil, Plant-assisted synthesis of gold nanoparticles for photocatalytic, anticancer, and antioxidant applications, *J. Saudi Chem. Soc.*, **26**(2), 101419 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101419>
24. R. Balakrishnan, D. Vijayaraja, S.H. Jo, P. Ganesan, I. Su-kim, D.K. Choi, Medicinal profile, phytochemistry, and pharmacological activities of *Murraya koenigii* and its primary bioactive compounds, *Antioxidants*, **9**(2), 101 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9020101>
25. S. Bhardwaj, S. Lata, R. Garg, Phyto-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Acmella oleracea* leaf extract: Antioxidant and catalytic activity, *Pharmacogn. Mag.*, **18**(77), 22 (2022). Doi: [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_586\\_20](https://doi.org/10.4103/pm.pm_586_20)

26. R.N. Gacche, N.A. Dhole, Antioxidant and possible anti-inflammatory potential of selected medicinal plants prescribed in the Indian traditional system of medicine, *Pharm. Biol.*, **44**(5), 389-395 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1080/13880200600751691>

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

R. Garg, R. Sharma, D. Puria, N.O. Eddy, Analysis of phytochemical composition, antioxidant activity, and  $\beta$ -glucuronidase inhibition potential of *Arisaema tortuosum* leaf extract, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1021-1038 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106817>

## Aporte al desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost

Mónica Fernández Lozano<sup>1a</sup>, Diana Millán<sup>2b</sup>, Ronald A Jiménez Cruz<sup>1b\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Semillero ABC, Grupo de investigación en Química Aplicada INQA, Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup>Universidad El Bosque, Facultad de Medicina, Grupo de investigación básica y translacional (GIBAT), Bogotá D.C., Colombia.

Correos electrónicos:

<sup>1a</sup>mfernandezl@unbosque.edu.co, <sup>2a</sup>millandiana@unbosque.edu.co, <sup>1b</sup>rajimenez@unbosque.edu.co

\*Autor de correspondencia.

Recibido: 19 de abril de 2023

Revisado: 27 de julio de 2023

Aceptado: 30 de julio de 2023

### RESUMEN

**Introducción:** el glaucoma 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 nanogel debido a su alto contenido de agua y tamaño nanométrico son una alternativa adecuada para la administración ocular. **Objetivo:** diseñar un prototipo de nanogel a base de gelatina mediante el método emulsión-gelación para la administración ocular de latanoprost, que fueron caracterizados por su tamaño y distribución de tamaños, capacidad de sorción, eficiencia de carga, propiedades viscoelásticas, isotonicidad y citotoxicidad. **Resultados:** se obtuvieron nanogel con un tamaño entre 225 a 874 nm, un rendimiento entre 16-30%, una capacidad de sorción entre 22-46% y una eficiencia de carga del 58%. Adicionalmente, estos sistemas se ajustan a una cinética Korsmeyer Peppas. Las propiedades reológicas muestran un comportamiento viscoelástico con flujo pseudoplástico recomendable para lograr una residencia controlada en la conjuntiva y esclerótica del ojo. Los nanogel obtenidos no fueron citotóxicos para fibroblastos e isotónicos. **Conclusiones:** los resultados obtenidos indican que los nanogel con latanoprost son una alternativa en el tratamiento del glaucoma.

**Palabras clave:** Nanogel, gelatina, latanoprost, emulsión-gelación, glaucoma.

## SUMMARY

### Contribution to the development of a nanogel for the controlled release of latanoprost

**Introduction:** Glaucoma is considered the second cause of blindness in the world. The development of alternatives that provide a better quality of life has been one of the most important purposes of pharmaceutical sciences. Due to their high-water content and nanometric size, nanogels are a suitable alternative for ocular administration. **Aim:** To design a prototype gelatin-based nanogel using the emulsion-gelation method for the ocular administration of latanoprost, characterized by their size and size distribution, sorption capacity, loading efficiency, viscoelastic properties, isotonicity, and cytotoxicity. **Results:** Nanogels with a size between 225 and 874 nm, a yield between 16-30%, a sorption capacity between 22-46%, and loading efficiency of 58% were obtained. Additionally, these systems conform to Korsmeyer-Peppas kinetics. The rheological properties show a viscoelastic behavior with a pseudoplastic flow that is recommended to achieve a controlled residence in the conjunctiva and sclera of the eye. The nanogels obtained were not cytotoxic for fibroblasts and were isotonic. **Conclusions:** The results obtained indicate that nanogels with latanoprost are an alternative in the treatment of glaucoma.

**Keywords:** Glaucoma, nanogel, latanoprost, controlled release, ocular administration.

## RESUMO

### Contribuição para o desenvolvimento de um nanogel para liberação controlada de latanoprost

**Introdução:** o glaucoma é considerado a segunda causa de cegueira no mundo. O desenvolvimento de alternativas que proporcionem uma melhor qualidade de vida tem sido um dos propósitos mais importantes no campo das ciências farmacêuticas. Devido ao seu alto teor de água e tamanho nanométrico, os nanogéis são uma alternativa adequada para administração ocular. **Objetivo:** projetar um protótipo de nanogel à base de gelatina usando o método de emulsão-gelificação para administração ocular de latanoprost, que foram caracterizados por tamanho e distribuição de tamanho, capacidade de sorção, eficiência de carregamento, propriedades viscoelásticas, isotonicidade e citotoxicidade. **Resultados:** nanogéis com tamanho entre 225 a 874 nm, rendimento entre 16-30%, capacidade de sorção entre 22-46% e

eficiência de carga de 58% foram obtidos. Além disso, esses sistemas estão em conformidade com a cinética de Korsmeyer Peppas. As propriedades reológicas mostram um comportamento viscoelástico com fluxo pseudoplástico que é recomendado para alcançar uma residência controlada na conjuntiva e esclera do olho. Os nanogéis obtidos foram não citotóxicos para fibroblastos e isotônicos. **Conclusões:** os resultados obtidos indicam que os nanogéis com latanoprost são uma alternativa no tratamento do glaucoma.

**Palavras-chave:** Nanogel, gelatina, latanoprost, emulsão-gelificação, glaucoma.

## INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa del nervio óptico, que representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que, es considerada como la segunda causa principal de ceguera en el mundo [1]. Actualmente, se encuentran alrededor de 78 millones de personas con esta patología y se estima que este número llegará a 111.8 millones para 2040 [1]. En Colombia, a través de algunos estudios se ha detectado que más de 2.300.000 de personas presentan dicha patología, en donde, alrededor de 50% de ellos no lo saben [2].

Su tratamiento principalmente es manejado con gotas oftálmicas de principios activos hidrófobos como lo son los análogos de prostaglandinas donde se encuentran el bimatoprost y latanoprost, los cuales son usados como fármacos de primera línea debido a que presentan una mayor capacidad en la reducción de la presión intraocular entre un 28–33% [3]. Sin embargo, estos fármacos presentan una gran limitación a nivel comercial, debido a que el 90% de las formulaciones oftálmicas comercializadas son formas farmacéuticas líquidas de liberación inmediata [4], y tan solo hay sistema de implante de bimatoprost aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) en el 2020; no obstante, estas formas presentan un gran desafío en cuanto a la barrera fisiológica y al alto recambio del líquido lagrimal, lo que limita el tiempo de retención del fármaco, además de que el uso crónico requiere de sistemas multidosis con agentes conservantes, que se asocian con un aumento de la toxicidad y de los efectos adversos (irritación, fotofobia o ardor por su aplicación diaria) afectando la eficacia terapéutica y una baja adherencia del paciente al tratamiento [3].

En los últimos veinte años las publicaciones y citas sobre investigaciones relacionadas con la administración ocular de fármacos aumentaron un 746,15%, evidenciando las tendencias actuales, los patrones de colaboración global, los puntos críticos de investigación y las fronteras emergentes en este tema, donde la administración ocular de



fármacos para el tratamiento de glaucoma se encuentra dentro de las principales líneas de investigación [5].

Por lo tanto, surge la necesidad de buscar nuevas estrategias para administrar principios activos con una liberación controlada, para reducir los intervalos de administración, reduciendo los costos del tratamiento y mejorando la adherencia de los pacientes al tratamiento. Los nanogeles son sistemas de administración, que ofrecen grandes ventajas como: una mayor biodisponibilidad, liberación controlada, mejor adherencia y una reducción de los efectos adversos al ser sistemas más amigables y biocompatibles [4].

De acuerdo con lo anterior, se propuso el diseño de un nanogel a base de polímeros naturales como la gelatina por su buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo costo, mediante el método de emulsión-gelación, en el cual, se variaron las condiciones que afectaron el tamaño de partícula como la cantidad de fase acuosa y tensoactivo, el porcentaje de amplitud de onda, el tiempo de homogenización por sonda ultrasónica, el tiempo y revoluciones de agitación.

## METODOLOGÍA

### Materiales

Gelatina tipo B, glutaraldehído 25% (GTA), monooleato de sorbitan 80 y dimetilsulfóxido empleados fueron marca SIGMA-ALDRICH. Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suero fetal bovino, antibióticos, vitaminas, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromuro) y PBS para los ensayos de citotoxicidad fueron marca GIBCO. Otros reactivos empleados fueron de grado analítico.

### Preparación de Nanogeles

Los nanogeles fueron preparados modificando la metodología emulsificación-gelación descrita por Jiménez *et al.* [6]. Se prepararon dispersiones de gelatina en agua purificada a una concentración final de 2,5% p/p con 0,1% p/p de glutaraldehído a 70 °C por 10 minutos con agitación magnética 500 rpm hasta la dispersión total de la gelatina. Posteriormente, 10 mL de cada dispersión fue adicionada lentamente sobre 40 mL de la fase oleosa compuesta de aceite mineral con un 10% de monooleato de sorbitán 80, esta mezcla fue homogenizada empleando una sonda ultrasónica (60 Hz con una amplitud del 50%) por 10 min, en un baño de hielo para favorecer la gelación de las partículas [6], seguido de agitación magnética constante por 1 hora a 1400 rpm. Finalmente, la emulsión formada fue almacenada a 4 °C por 24 horas hasta la gelación

total de los nanogeles, que fueron purificados por centrifugación ( $1850 \times g / 30 \text{ min}$ ) y lavados con mezclas etanol: agua 1:1. Se elaboraron tres lotes de nanopartículas.

### Incorporación de latanoprost en los Nanogeles

La incorporación del latanoprost en los nanogeles se realizó mediante sorción [6] de una solución saturada del principio activo (0,0129 mg/mL) sobre los nanogeles por 12 horas. Posteriormente, se retiró el exceso de solución de latanoprost y los nanogeles cargados fueron almacenados a  $4^\circ\text{C}$ . Fueron cargados tres lotes independientes de nanopartículas. Los pesos iniciales y finales de los nanogeles fueron tomados para determinar la capacidad de sorción de los nanogeles.

### Liberación *In vitro* de latanoprost

Para el estudio de liberación *in vitro* de latanoprost se tomaron 100 mg de nanogeles cargados en tubos eppendorf con 1 mL del medio de liberación (buffer de fosfatos con pH 7,4). Se colocaron las muestras en un agitador orbital a 100 rpm a  $37^\circ\text{C}$ . A diferentes tiempos (1, 24, 48, 72, 96, 168 h) se tomaron los sobrenadantes y el latanoprost fue cuantificado por UV-Vis.

### Cuantificación de latanoprost

El porcentaje de *latanoprost* liberado, se determinó empleando un Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis a una longitud de 210 nm [7]. Se construyó una curva de calibración con concentraciones de 0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0  $\mu\text{g/mL}$  de latanoprost.

### Eficiencia de carga

La eficiencia de carga de las nanogeles se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de latanoprost en el nanogel}}{\text{Cantidad de latanoprost adicionada en la elaboración del nanogel}} \times 100\%$$

### Cinética de liberación de fármacos

La cinética de liberación de latanoprost, los datos obtenidos en la liberación *in vitro* se ajustaron a diferentes modelos cinéticos: Orden Cero ( $m_0 - m = K_t$ ), primer orden ( $\log m = \log m_0 - K_t / 2,303$ ), modelo Korsmeyer-Peppas ( $m_0 - (m / m_0) = Kt^n$ ) y modelo Higuchi ( $m_0 - m = Kt^{1/2}$ ) donde  $m$  es la cantidad de fármaco restante en la formulación en el momento  $t$  y  $m_0$  es la cantidad inicial del fármaco en la formulación. Con los valores del coeficiente de correlación (R)<sup>2</sup> se encontró el modelo que más se ajusta a la liberación obtenida.

### **Análisis de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)**

Se realizó ATR-FTIR en un espectrómetro ALPHA II BRUKER en un rango de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  con 25 escáneres por muestra.

### **Microscopía óptica**

El tamaño de los nanogeles obtenidos cargados y sin cargar se estudió mediante microscopía óptica usando un microscopio invertido Primo Vert en 40x acoplado a un *Software* ZEN lite. Para cada réplica se analizaron 200 diámetros de partículas diferentes con ayuda del programa ImageJ. Para cada lote se determinó la distribución de tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI), empleando la siguiente ecuación:

$$\text{PDI} = \left[ \frac{\sigma}{2a} \right]^2$$

donde,  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar y  $a$  corresponde a la media del diámetro de las nanopartículas.

### **Pruebas reológicas**

El comportamiento viscoelástico se estudió empleando hidrogeles de gelatina. Dispersiones de gelatina en agua purificada a diferentes concentraciones (2,5% y 5% p/p) con 0,1% p/p de glutaraldehído a 70 °C con agitación magnética (400 rpm / 10 min) fueron preparadas. Posteriormente, cada dispersión fue servida en moldes de plástico que fueron almacenados a 4 °C por 24 horas hasta la gelación del hidrogel. Las propiedades viscoelásticas se evaluaron en un reómetro oscilatorio Anton Paar equipado con una geometría placa / placa bajo condiciones de frecuencia constante (1Hz), un rango de deformación entre 0,01 a 100% y un rango de tasa de corte entre 0 a 100  $\text{s}^{-1}$  a temperatura ambiente [8]. Para el registro y análisis de los datos se utilizó el *software* RheoCompass.

### **Ensayo de Citotoxicidad**

La evaluación de la reactividad biológica *in vitro* de los nanogeles fue realizada de acuerdo con la norma ISO-10993-5 [9]. Fibroblastos L929 fueron cultivados en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibióticos y vitaminas, en cajas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de  $10^5$  células por pozo, durante 24 horas, a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ . Extractos de los nanogeles en solución salina estéril 0,9% a una concentración de 0,2 g/mL fueron incubados por 24 horas. Después de la incubación, 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron colocados sobre los fibroblastos y cultivados durante

24 horas, a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La viabilidad celular fue determinada empleando MTT y cuantificado por UV-Vis a 560 nm.

### **Osmolaridad**

Se empleó un osmómetro FPOSM- V2.0 para determinar la osmolaridad de diferentes dispersiones de nanogeles en agua purificada (0,1%, 0,5% y 1,0%).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La administración ocular de fármacos para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas presenta una serie de desafíos desde el punto de vista del diseño de sistemas de entrega. Para el caso de enfermedades del globo ocular, estos deben ser biocompatibles con la conjuntiva y tejidos circundantes, permitir la liberación controlada para reducir los efectos secundarios indeseados y ser económicos para favorecer el acceso a este tipo de tratamientos. Los geles a escala micro y nano son una alternativa para desarrollar sistemas de entrega compatibles debido a su alto contenido de agua [10] y facilidad de escalamiento. Nosotros, propusimos el desarrollo de un sistema de entrega ocular para la liberación de latanoprost biocompatible, de bajo costo y de fácil transferencia tecnología a la aplicación clínica, a partir de un polímero derivado del colágeno, principal componente de la matriz extracelular de tejidos blandos, económico y biocompatible.

### **Preparación de nanogeles**

El método de preparación emulsificación-gelación es ampliamente utilizado para la obtención de tamaños micro y nanométricos, debido a su fácil manejo y altos rendimientos [6]. Sin embargo, existen diferentes factores que afectan el tamaño y eficiencia tanto de la estructura como la encapsulación de los fármacos en los nanogeles, como el polímero seleccionado, su viscosidad, relación de fases (acuosa-oleosa) y método de homogeneización [6]. La Tabla 1 muestra las condiciones utilizadas para la estandarización del tamaño de partículas para la obtención de los nanogeles con mejores propiedades y tamaño.

Los parámetros de proceso que más influyeron en la obtención de tamaños nanométricos fueron las concentraciones de gelatina y de tensoactivo, la amplitud de sonicación (energía) y agitación.

Una mayor concentración de polímero favorece un mayor tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, debido a la rápida solidificación de las partículas, además de un aumento en la viscosidad, lo cual, reduce la porosidad de estos sistemas [11]. Al dis-

minuir la concentración de gelatina al 2,5 % se logró un menor tamaño de partícula, sin embargo, así mismo se obtuvieron bajas eficiencias como se observa en el anexo 4 del material suplementario. La mayor concentración de tensoactivo favorece a reducir el crecimiento de gota de la fase interna -fenómeno de Oswald- presente en estos sistemas heterodispersos, y reducir de esta forma el tamaño de la partícula [12].

**Tabla 1.** Condiciones para la estandarización de nanogeles de gelatina.

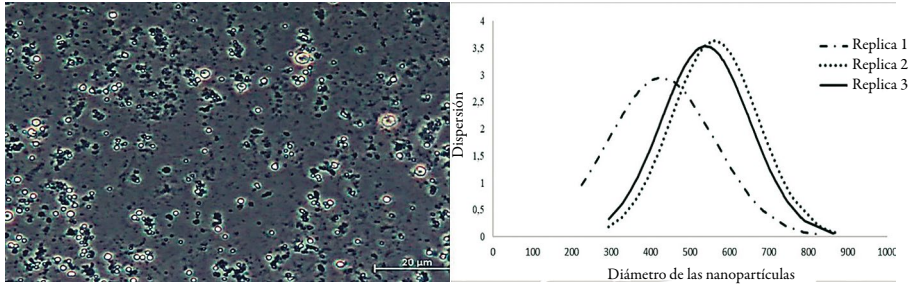
Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición Final
Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 $\mu$ L de GTA Monooleato de sorbitán 5 % Sonicación 30 % de amplitud / 10 min Agitación 1140 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 27-5 $\mu$ m	Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 $\mu$ L de GTA Monooleato de sorbitán 5 % Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1400 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 11-2 $\mu$ m	Fase W: 0,5 g de gelatina con 9,52 g de agua y 37,7 $\mu$ L de GTA Monooleato de sorbitán 10% Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1400 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 612 nm - 3 $\mu$ m	Fase W: 0,25 g de gelatina con 9,8 g de agua y 37,7 $\mu$ L de GTA Monooleato de sorbitán 10% Sonicación 50 % de amplitud / 10 min Agitación 1200 rpm por 1 hora Diámetro de partícula: 225-860 nm

Por otra parte, la homogeneización por sonda ultrasónica -es un método de alta energía- permite superar las limitaciones de viscosidad para dispersar la fase interna de la emulsión en pequeñas gotas de tamaño nanométrico que forman los nanogeles tras la reticulación con el GTA a bajas temperaturas [13], razón por la cual se seleccionó una amplitud de 50% en 10 min [14].

### Estudio del tamaño de nanogel mediante Microscopía óptica

El tamaño nanométrico de las partículas obtenidas es un parámetro de suma importancia, ya que, favorece la administración de fármacos a nivel oculares debido a que ayudan a minimizar la irritación en el tejido ocular, disminuyen la visión borrosa y mejoran la permeación ocular [15].

En la Figura 1A se puede observar las nanopartículas vistas por microscopio y la distribución de tamaño de los nanogeles (Figura 1B). Se obtuvieron nanogeles con una baja dispersión en la distribución de tamaño, con índices de Polidispersión (PdI) de 0,025, 0,010 y 0,011 respectivamente, con una media de 0,015. Estos resultados son adecuados para la administración de estos sistemas en el ojo, ya que, se reporta que el tamaño adecuado para no generar molestias en los ojos son partículas hasta 10  $\mu$ m [16].



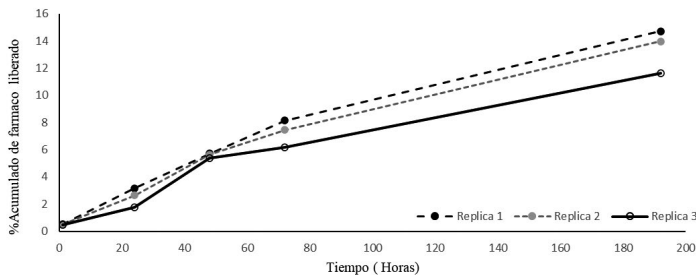
**Figura 1.** Tamaño y distribución de los nanogeles. Figura 1A. Imagen de microscopía óptica de los nanogeles. Figura 1 B. Gráfica de distribución de tamaño de las réplicas de los nanogeles.

### Rendimiento de los nanogeles

Se obtuvieron rendimientos del 30, 21 y 16 % del proceso de obtención de nanogeles. Estos porcentajes son bajos para los nanogeles desarrollados por un método de alta energía como la Sonicación, el cual es favorable para la obtención de nanopartículas con mayores rendimientos [13]. Sin embargo, estos resultados se atribuyen al complejo proceso de purificación, en donde se requieren largos tiempos de centrifugación y extensivos lavados para lograr una buena separación de las fases y así lograr la eliminación total de la fase oleosa sin presentar pérdida de la fase acuosa [17].

### Estudio de liberación *in vitro* de latanoprost

La figura 2 muestra el perfil de liberación *in vitro* de latanoprost. Se observó una liberación sostenida del activo durante los primeros ocho días. Siendo, más rápida las primeras 48 horas (mayor pendiente de la gráfica) y luego se observó una liberación más lenta hasta el octavo día del ensayo. Tan solo el 15% de la cantidad total de latanoprost cargado en los nanogeles fue liberado. El fármaco remanente puede ser liberado a medida que los nanogeles se degradan [18].



**Figura 2.** Estudio de liberación *in vitro* de latanoprost. La flecha indica el cambio de velocidad de la liberación.

## Cinética de liberación

Las diferentes cinéticas de liberación *in vitro* de latanoprost se observan en el anexo 2 del material suplementario. El modelo con mejor  $R^2$  fue el modelo Korsmeyer Peppas (Tabla 2). Este modelo describe el mecanismo de liberación controlada en sistemas poliméricos que presentan hinchamiento [19]. Por lo cual, se puede inferir que los nanogeles funcionan como sistemas de liberación controlada por la relajación de las cadenas poliméricas que permite generar la penetración del medio de disolución en la matriz, formando poros y erosionándola, la cual, mediante el proceso de difusión hace que el fármaco se libere constantemente [20].

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación de los modelos cinéticos ajustados al perfil de liberación nanogeles.

Lote	Orden cero ( $R^2$ )	Primer orden ( $R^2$ )	Modelo de Higuchi ( $R^2$ )	Korsmeyer-Peppas ( $R^2$ )
1	0,965	0,636	0,981	0,994
2	0,966	0,648	0,977	0,987
3	0,943	0,662	0,962	0,951

## Eficiencia de Carga

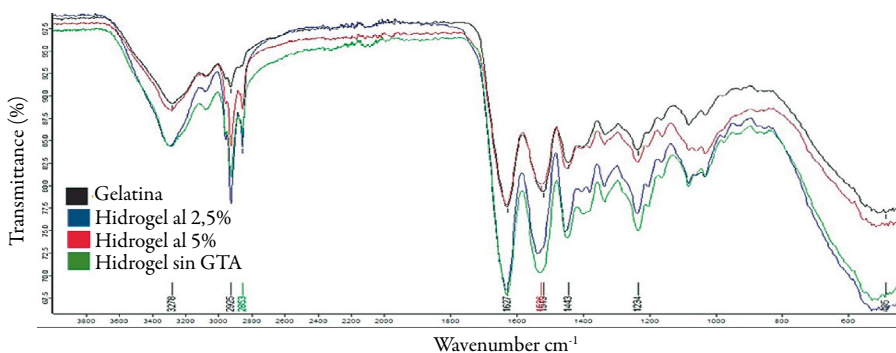
El método de sorción del principio activo permitió obtener una eficiencia de carga entre 46- 58%, la cual, es representativa teniendo en cuenta los bajos rendimientos y capacidad de carga que se obtuvieron en los nanogeles, debido a la concentración de gelatina y su efecto en las propiedades viscoelásticas. Además, se ha encontrado en la literatura que la eficiencia de carga para estos sistemas puede ser baja, dependiendo del material, concentración o agente reticulante empleado [16]. Por ejemplo, se ha reportado en la literatura que un sistema híbrido de nanopartículas de gelatina-HPMC para administrar fármacos agentes reductores de la PIO (Presión intraocular) tuvieron una eficiencia de carga del  $58,7 \pm 3,8$  % [21]. Por otra parte, Cheng y su equipo realizaron un hidrogel de quitosano/gelatina/fosfato de glicerol para la liberación sostenida de latanoprost, obteniendo como resultado una eficiencia de carga del  $67,72 \pm 4,25$ % [22].

## Espectros FT-IR

La Figura 3 muestra el espectro FT-IR de los nanogeles, se observan señales representativas como la señal en  $3278\text{ cm}^{-1}$ , el cual se asocia al enlace N-H de los grupos amina libres en los terminales de la estructura de gelatina libres que no reaccionaron con el glutaraldehído. Las señales en  $2925\text{ cm}^{-1}$  y  $2863\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a vibraciones del enlace C-H que está presente a lo largo de la cadena de gelatina. La tensión en  $1627\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones del enlace C=O que se asocia a residuos de

glutaraldehído que quedaron sin reaccionar, así como la señal en  $1526\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones del enlace  $\text{C}=\text{N}$  que está directamente relacionado con la reacción de entrecruzamiento formando el grupo imina [23].

Los espectros infrarrojos de las nanopartículas cargadas con latanoprost (material suplementario anexo 3) no mostraron señales nuevas o eliminación de alguno de los anteriormente descritos. Indicando que los nanogeles son sistemas prometedores para la incorporación de latanoprost al no presentar problemas de interacción o inestabilidad química con la composición del sistema (Gelatina).



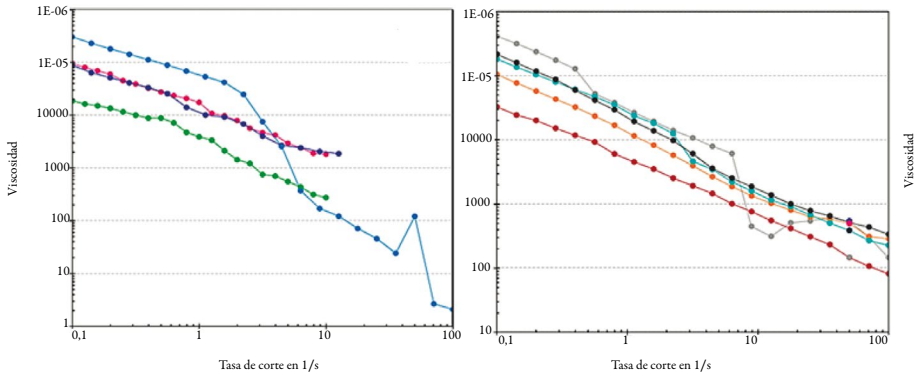
**Figura 3.** Espectro FT-IR de hidrogel sin latanoprost. Las flechas muestran las señales más representativas.

### Pruebas Reológicas

Las propiedades reológicas de estos sistemas son importantes, pues brindan información sobre el comportamiento del material, su estabilidad en el tiempo y por tanto su vida útil [24]. Se encontró que estos sistemas presentan una viscosidad tipo viscoelástico, en la cual a medida que aumenta la tasa de corte va disminuyendo la viscosidad [25], como se observa en la Figura 4, lo cual, es favorable para la administración y estabilidad de estos sistemas en el ojo.

La figura 4, muestra que la viscosidad es mayor en los hidrogel con GTA en comparación con el hidrogel sin GTA (color rojo en 2,5% y verde en 5%), lo cual, indica que la reticulación favorece el aumento de la viscosidad haciendo más estables estos sistemas [26]. Por otra parte, se obtuvo con las gráficas una viscosidad general para cada hidrogel de  $1879,6\text{ mPa}\cdot\text{s}$  para los hidrogel de 2,5% y  $2110,3\text{ mPa}\cdot\text{s}$  para los de 5%.

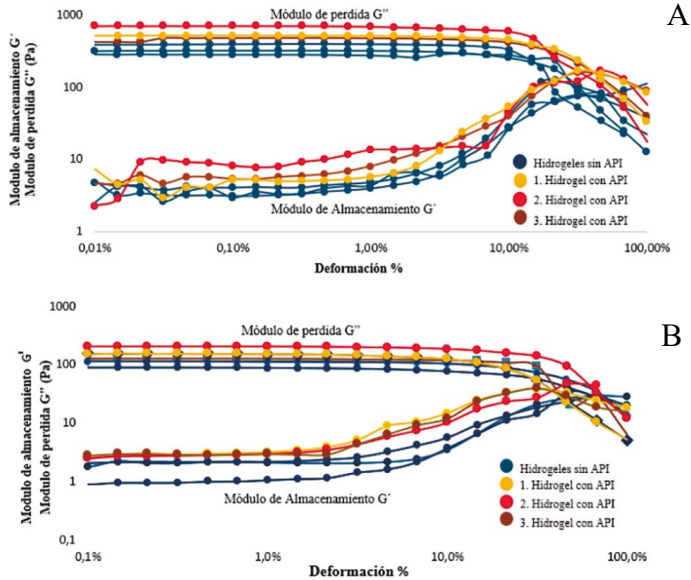




**Figura 4.** Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles. A. Viscosidad (mPa-s) en función de la tasa de corte de los hidrogeles al 2,5 %. B. Viscosidad en función de la tasa de corte de los hidrogeles al 5 %.

Los módulos de pérdida y almacenamiento de energía de los hidrogeles se observan en la figura 5. Se observó un comportamiento similar en cada réplica iniciando con un módulo de almacenamiento  $G'$  (componente elástico) mayor hasta cierto punto donde hay un cambio y el gel empieza su tendencia a ser un material viscoelástico al aumentar el módulo de pérdida (comportamiento viscoso). De igual manera, se observa como al incrementar la concentración de gelatina hay un aumento (hasta 715 Pa) en el módulo de almacenamiento en comparación con los hidrogeles al 2,5% que presenta un máximo de 200 Pa. Mientras que ocurre lo contrario para el módulo de pérdida [6].

Por otra parte, se evidencia un punto de cruce definido en cada una, indicando el punto donde  $G'$  y  $G''$  asumen el mismo valor, el cual, es representativo de un gel con propiedades viscoelásticas. De esta manera, se analiza de la figura 5A que los hidrogeles cargados con el principio aumentaron el porcentaje de deformación en que se encontraba el punto de gel viscoelástico, mientras que en la Figura 5B se observa como los hidrogeles al 2,5% de gelatina mostraron una disminución en el porcentaje de deformación en un con respecto a los hidrogeles sin principio, concluyendo que la incorporación de latanoprost tiene un mayor impacto sobre las propiedades viscoelásticas en hidrogeles con concentraciones menores, ya que, se va a requerir una menor deformación para lograr esta propiedad viscoelástica que favorece la administración de fármacos oculares [27].



**Figura 5.** Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles. A. Módulo de almacenamiento  $G'$  y pérdida  $G''$  de hidrogeles al 2,5%. B. Módulo de almacenamiento  $G'$  y pérdida  $G''$  de hidrogeles al 5%.

### Osmolaridad

Las dispersiones nanogel cargados a las diferentes concentraciones presentaron una osmolaridad de 262,4 a 285,0 mEq/g. Estos resultados se encuentran en los rangos permitidos para sistemas de administración ocular, reduciendo el riesgo de lisis celular e irritabilidad tisular [28].

### Citotoxicidad

Los nanogel sin carga y cargados con latanoprost mostraron valores de viabilidad celular superiores al 90%. Estos resultados sugieren que el método de elaboración, purificación y carga con latanoprost no dejó residuos tóxicos.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se logró la optimización de las condiciones de elaboración para un prototipo de nanogel mediante el método emulsificación-gelación, evidenciando que las variables más significativas en la obtención de tamaños nanométricos son las concentraciones de gelatina y tensoactivos empleados, igualmente la amplitud y tiempo de agitación por sonda ultrasónica. Con estas variables de procesos definidas, se pudie-

ron obtener nanogeles cargados con latanoprost, un tamaño y distribución de tamaño, viscoelasticidad y reactividad biológica *in vitro* (citotoxicidad y osmolaridad) para ser administrados por vía ocular.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. World glaucoma week. URL: <https://www.worldglaucomaweek.org/what-is-glaucoma/>. Revisado en octubre de 2021.
2. D. Cabrera, *En Colombia más de dos millones de personas sufren de glaucoma*, 2021. URL: <https://www.rcnradio.com/recomendado-del-editor/en-colombia-mas-de-dos-millones-de-personas-sufren-deglaucoma#:~:text=En%20Colombia%20m%C3%A1s%20de%202.300,que%20padecen%20esa%20enfermedad%20ocular>, Revisado en octubre de 2021.
3. J.R. Franca, G. Foureaux, L.L. Fuscaldi, T.G. Ribeiro, R.O. Castilho, M.I. Yoshida, V.N. Cardoso, S.O.A Fernandes, S. Cronemberger, J.C. Nogueira, A.J. Ferreira, A.A.G. Faraco, Chitosan/hydroxyethyl cellulose inserts for sustained-release of dorzolamide for glaucoma treatment: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, **570**, 118662 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118662>
4. A. Patel, K. Cholkar, V. Agrahari, A.K. Mitra, Ocular drug delivery systems: An overview, *World Journal of Pharmacology*, **2**, 47-64 (2013). Doi: <https://doi.org/10.5497/wjp.v2.i2.47>
5. Ch. Peng, L. Kuang, J. Zhao, A.E. Ross, Zh. Wang, J.B. Ciolino, Bibliometric and visualized analysis of ocular drug delivery from 2001 to 2020, *Journal of Controlled Release*, **345**, 625-645 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.031>
6. R.A. Jiménez, D. Millán, A. Sosnik, M.R. Fontanilla, Aloe vera–eluting collagen I microgels: physicochemical characterization and *in vitro* biological performance, *Materials Today Chemistry*, **23**, 100722 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100722>

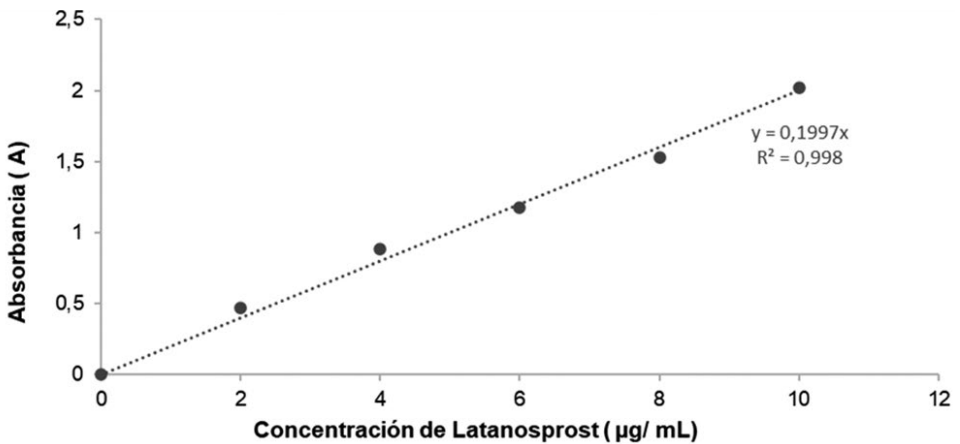
7. S. Sawatdee, H. Phetmung, T. Srichana, Development of a stable latanoprost solution for use as eye drops, *Chiang Mai Journal of Science*, **40**, 656-668 (2013).
8. S.R. Derkach, S.O. Ilyin, A.A. Maklakova, V.G. Kulichikhin, A.Y. Malkin, The rheology of gelatin hydrogels modified by  $\kappa$ -carrageenan, *LWT - Food Science and Technology*, **63**, 612-619 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.024>
9. R.F. Wallin, E.F. Arscott, A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity, *Medical Device and Diagnostic Industry*, **20**, 96-98 (1998).
10. F. Pinelli, Ó.F. Ortola, P. Makvandi, G. Perale, F. Rossi, *In vivo* drug delivery applications of nanogels: A review, *Nanomedicine* (Lond), **15**(27), 2707-2727 (2020). Doi: <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0274>
11. H.H. Jayanudin, A review of encapsulation using emulsion crosslinking method, *World Chemical Engineering Journal*, **5**, 37-43 (2021).
12. M.M. Bommana, B. Kirthivasan, S.S. Gupta, A. Shikhar, A. Shah, Nanostructures in pharma: Elixir to oral medicine, en: A.M. Grumezescu (editor), *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, William Andrew Publishing, 2019, p. 23-44.
13. T.M. Silva, N.N.P. Cerize, A.M. Oliveira, The effect of high shear homogenization on physical stability of emulsions, *International Journal of Chemistry*, **8**(4), 52-61 (2016).
14. M.A. Cabrera-Trujillo, L.I. Sotelo-Díaz, M.X. Quintanilla-Carvajal, Efecto de la amplitud y pulsación en ultrasonido de sonda a baja frecuencia sobre emulsiones aceite/agua, *DYNA*, **83**, 63-68 (2016).
15. R.S. Abdel-Rashid, D.A. Helal, M.M. Omar, A.M. El Sisi, Nanogel loaded with surfactant based nanovesicles for enhanced ocular delivery of acetazolamide, *International Journal of Nanomedicine*, **14**, 2973-2983 (2019). Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S201891>
16. S. Maiti, S. Jana, B. Laha, Cationic polyelectrolyte–biopolymer complex hydrogel particles for drug delivery, en: A.M. Grumezescu (editor), *Design and Development of New Nanocarriers*, William Andrew Publishing, 2018, p. 223-256.
17. G. Levourch, N. Lebaz, A. Elaissari, Hydrophilic submicron nanogel particles for specific recombinant proteins extraction and purification, *Polymers* (Basel), **12**, 1413 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12061413>

18. X. Xu, S. Shen, R. Mo, Bioresponsive nanogels for protein delivery, *View*, **3**(1), 20200136 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1002/VIW.20200136>
19. D. Yañez, *Evaluación de cinéticas de liberación de alimentos medicados a base de benzoato de emamectina, utilizando medios alternativos de disolución*, Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 2013.
20. N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chemical Reviews*, **116**, 2602-2663 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
21. S. Esteban-Pérez, V. Andrés-Guerrero, J.J. López-Cano, I. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna, Gelatin nanoparticles-HPMC hybrid system for effective ocular topical administration of antihypertensive agents, *Pharmaceutics*, **12**(4), 306 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040306>
22. Y.-H. Cheng, K.-H. Hung, T.-H. Tsai, Ch.-J. Lee, R.-Y. Ku, A.W.-h. Chiu, Sh.-H. Chiou, C.J.-l. Liu, Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan–gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension, *Acta Biomaterialia*, **10**(10), 4360-4366 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.act-bio.2014.05.031>
23. J.L. Patarroyo, J.S. Florez-Rojas, D. Pradilla, J.D. Valderrama-Rincón, J.C. Cruz, L.H. Reyes, Formulation and characterization of gelatin-based hydrogels for the encapsulation of *Kluyveromyces lactis*—Applications in packed-bed reactors and probiotics delivery in humans, *Polymers* (Basel), **12**, 1287 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12061287>
24. K. Oldörp, Product stability and shelf-life - What rheology has to do with it, Thermo Fisher Scientific, Inc. URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Application-Notes/V260-e-Product\\_Stability\\_or\\_Shelf\\_Life\\_\\_\\_What\\_Rheology\\_Has\\_to\\_Do\\_with\\_it.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Application-Notes/V260-e-Product_Stability_or_Shelf_Life___What_Rheology_Has_to_Do_with_it.pdf), Revisado en febrero de 2022.
25. Anton Paar GmbH, Reología en Polímeros. URL: [https://www.youtube.com/watch?v=Z88Ve\\_eYryY](https://www.youtube.com/watch?v=Z88Ve_eYryY), Consultado en febrero de 2022.
26. P. Panyamao, W. Ruksiriwanich, P. Sirisa-Ard, S. Charumanee, Injectable thermosensitive chitosan/pullulan-based hydrogels with improved mechanical properties and swelling capacity, *Polymers* (Basel), **12**(11), 2514 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/polym12112514>

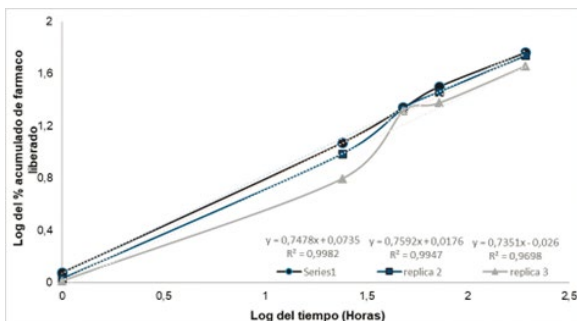
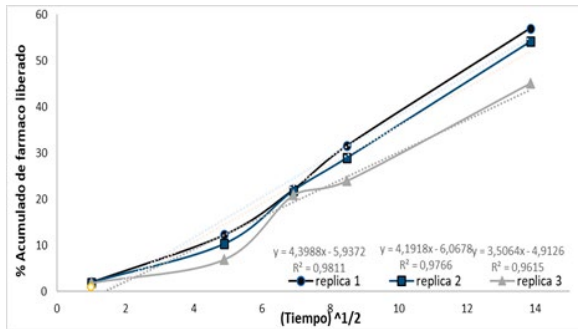
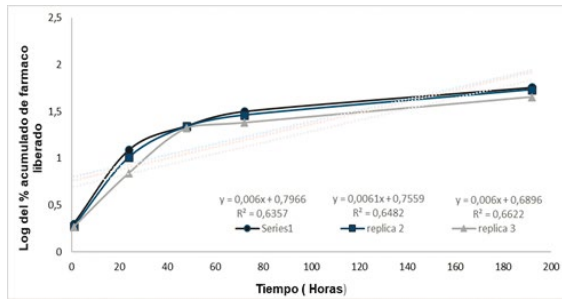
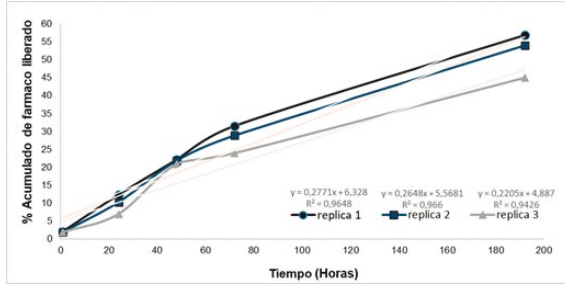
27. X. Hong, J.P. Stegemann, Ch.X. Deng, Microscale characterization of the viscoelastic properties of hydrogel biomaterials using dual-mode ultrasound elastography, *Biomaterials*, **88**, 12-24 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.019>
28. S. Nikam, A. Ghule, A. Inde, A. Jambhulkar, Advancement in ocular drug delivery system to overcome ocular barrier, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **71**(2), 90-97 (2021).

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

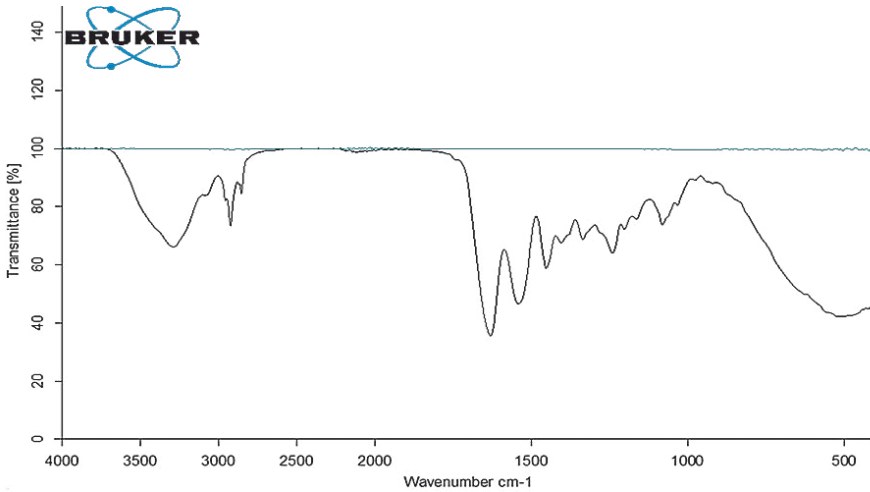
**Anexo 1.** Curva de calibración para la cuantificación de latanoprost



**Anexo 2.** Perfiles de liberación *in vitro* ajustadas a las diferentes cinéticas de liberación. (1a) Orden cero, (1b) Primer orden, (1c) modelo de Higuchi y (1d) modelo de Korsmeier-Peppas.



**Anexo 3.** Espectro IR de los nanogel cargados con latanoprost.



**Anexo 4.** Tabla resumen de las características obtenidas en cada réplica de nanogel.

Réplica	Tamaño (nm)	PdI	%Rendimiento	% Eficiencia de carga	% Sorción
1	225-860	0,025	30	58	46
2	293-874	0,010	21	55	37
3	294-864	0,011	16	46	22
Desviación	NA	0,015	7	6	12

**CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO**

M. Fernández-Lozano, D. Millan, R.A. Jiménez-Cruz, Aporte al desarrollo de un nanogel para la liberación controlada de latanoprost, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1039-1057 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110754>



# Análisis de la percepción de la población colombiana sobre uso de plantas medicinales mediante procesamiento de lenguaje natural (PLN)

Claudia Patricia Ortiz<sup>1</sup>, Manuelita Trujillo Monje<sup>2</sup>, Henry Steven Rebolledo-Cortes<sup>3</sup>, Henry Rubiano Daza<sup>4</sup>, Rossember Edén Cárdenas-Torres<sup>5</sup>, Daniel Ricardo Delgado<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>Programa de Administración en Seguridad y Salud en el Trabajo, Grupo de Investigación en Seguridad y Salud en el Trabajo, Corporación Universitaria Minuto de Dios-UNIMINUTO, Neiva 410001, Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Ciencia, Ingeniería e Innovación, Sifati Group Ingeniería S.A.S, Palermo, Huila, Colombia.

<sup>3</sup>Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Colombia.

<sup>4</sup>Grupo de Investigación en Dinámicas Sociales, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Neiva, Neiva 410001, Colombia.

<sup>5</sup>Grupo de Fisicoquímica y Análisis Matemático, Facultad de Ciencias y Humanidades, Fundación Universidad de América, Avenida Circunvalar No. 20-53, Bogotá 110321, Colombia.

<sup>6</sup>Grupo de Investigación de Ingenierías UCC-Neiva, Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Neiva, Neiva 410001, Colombia.

\*Autora de correspondencia: [claudia.ortiz.de@uniminuto.edu.co](mailto:claudia.ortiz.de@uniminuto.edu.co)

Recibido: 14 de abril de 2023

Revisado: 25 de julio de 2023

Aceptado: 31 de julio de 2023

## RESUMEN

**Introducción:** las plantas medicinales gozan de gran aceptación entre la población colombiana, la mayoría de la población en algún momento ha usado una planta medicinal para tratar algún tipo de patología. Colombia por ser uno de los países más biodiversos del mundo cuenta con una alta variedad de plantas con propiedades terapéuticas. **Objetivo:** evaluar la percepción de la población colombiana sobre el uso de plantas medicinales, este análisis se realizó mediante análisis de procesamiento natural utilizando Python. En términos generales, más del 90% de la población colombiana ha utiliza plantas medicinales en el tratamiento de alguna patología, además el 45% considera el uso de plantas medicinales como seguro y 6% las considera que es muy peligrosas. **Resultados:** uno de los hallazgos más importantes

es que más del 45% de la población ha cambiado la medicina tradicional por plantas medicinales los que puede generar pérdida de adherencia terapéutica generando complicaciones graves en la salud del individuo.

**Palabras clave:** Plantas medicinales, Colombia, propiedades medicinales, percepción, procesamiento de lenguaje natural.

## SUMMARY

### Analysis of the perception of the Colombian population on the use of medicinal plants through natural language processing (NLP)

**Introduction:** Medicinal plants enjoy great acceptance among the Colombian population, most of the population at some point has used a medicinal plant to treat some type of pathology. Colombia is one of the most biodiverse countries in the world, it has a high variety of plants with therapeutic properties. **Aim:** To evaluate the perception of the Colombian population about the use of medicinal plants, this analysis was carried out through Natural Processing Analysis using Python. In general terms, more than 90% of the Colombian population has used medicinal plants in the treatment of some pathology, in addition, 45% consider the use of medicinal plants as safe and 6% consider them to be very dangerous. **Results:** One of the most important findings is that more than 45% of the population has changed traditional medicine for medicinal plants, which can generate loss of therapeutic adherence, generating serious complications in the health of the individual.

**Keywords:** Medicinal plants, Colombia, medicinal properties, perception, natural language processing.

## RESUMO

### Análise da percepção da população colombiana sobre o uso de plantas medicinais por meio do processamento de linguagem natural (PNL)

**Introdução:** as plantas medicinais gozam de grande aceitação entre a população colombiana, a maioria da população em algum momento utilizou uma planta medicinal para tratar algum tipo de patologia. A Colômbia, um dos países com maior

biodiversidade do mundo, possui uma grande variedade de plantas com propriedades terapêuticas. Objetivo: avaliar a percepção da população colombiana sobre o uso de plantas medicinais, esta análise foi realizada através da análise de processamento natural usando Python. Em termos gerais, mais de 90% da população colombiana já utilizou plantas medicinais no tratamento de alguma patologia, além disso, 45% consideram o uso de plantas medicinais seguro e 6% as consideram muito perigosas. **Resultados:** um dos achados mais importantes é que mais de 45% da população trocou a medicina tradicional por plantas medicinais, o que pode gerar perda de adesão terapêutica, gerando sérias complicações na saúde do indivíduo.

*Palavras-chave:* Plantas medicinais, Colômbia, propriedades medicinais, percepção, processamento de linguagem natural.

## INTRODUCCIÓN

Por sus propiedades, el uso de las plantas medicinales (PM) para el tratamiento de problemas de salud ha estado presente en la evolución del hombre, no solo por sus prácticas costumbristas y de oralidad, sino porque ha sido articulado al sistema de saberes de los pueblos originarios [1]. Ante esta realidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha adoptado estrategias para el reconocimiento y apropiación de la Medicina Tradicional Complementaria, en adelante MTC, que incluye productos como hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos ingredientes [2].

Al cierre del año 2022, el 90 % de los países miembros de las OMS habían diseñado políticas y reglamentaciones para la promoción y prácticas del consumo de las plantas medicinales. Así mismo, en la actualidad se conoce de la existencia del Centro Mundial para la Medicina Tradicional, en la India, el cual tiene como objetivo generar un corpus fiable de evidencias y datos para las prácticas y los productos que utilizan las personas que hacen uso de plantas medicinales [3].

Pese a que sigue siendo subestimada, la práctica y el uso de las plantas medicinales cada vez es mayor, máxime si se tiene en cuenta problemas fitosanitarios como los derivados del Covid-19. Sin duda la MTC es considerada como una de las prácticas más populares en el mundo, no en vano su uso ha sido reconocido durante más de 2000 años en el sistema de salud chino y replicado en todo el mundo [4]. Como evidencia de lo

anterior, una investigación realizada con población de estudiantes y familiares en una universidad de la Sierra del Perú arrojó que el 99,63% de los estudiantes con Covid-19 usaron las hojas de eucalipto y del matico para tratar esta enfermedad [5].

Junto al resultado académico anterior, hay que destacar que la creciente practicidad del uso de plantas medicinales se ve reflejada igualmente en pacientes con cáncer (Aboufaras, et al., 2023) toda vez que se existen resultados beneficiosos y consecuencias adversas en tasas del 39 % y 16 %, respectivamente [6].

En el caso de Colombia, como segundo país más biodiverso del mundo se ha estudiado el uso de especies utilizadas con fines etnobotánicos [7], así como su relación cultural y comunitaria, encontrando, por ejemplo, que departamentos del sur del país, como Nariño, con una alta biodiversidad y diversidad cultural, este tipo de saberes son manejados más por mujeres que por hombres, y en su mayoría, son adultos mayores [8].

Valoyes-Milán y Palacios-Palacios (2020) [9] desarrollaron una gran revisión bibliográfica en Colombia sobre el uso de las plantas medicinales, usando sobre todo publicaciones relacionadas con Cauca y Chocó, que son regiones con una alta necesidad económica, pero con gran riqueza biodiversa, encontrando que el alto nivel del desarrollo y conocimiento del uso de las plantas está relacionado con el alto nivel de enfermedades dada la condición precaria de los grupos étnicos asentados en el territorio, lo que los lleva a hacer uso de las plantas medicinal para satisfacer sus necesidades medicinales básicas, concluyendo como ese conocimiento de cientos de años es una riqueza cultural de los pueblos, estos saberes se han acumulado desde prácticas ancestrales en la selección, manejo y la conservación de conocimientos transmitidos de una generación en generación (p. 93). Este estudio además presenta datos de 902 estudios del Choco y 276 del Cauca [9].

Estas investigaciones justifican, en parte, que la medicina tradicional es una práctica importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele denominarse medicina complementaria. Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, y prevenir y tratar enfermedades, en particular enfermedades crónicas [2].

Sumado a lo anterior la OMS dio a conocer que entre los productos que más se descargaron entre el año 2022 y 2023 fueron las directrices relacionadas con la medicina tradicional y complementaria, sumada al fomento de la actividad física, el asesoramiento rápido sobre el empleo de imágenes de las vías respiratorias en relación con la Covid-19 y a especificaciones técnicas para tomar la tensión arterial, las políticas relativas a los precios de los productos farmacéuticos y al cribado y tratamiento para la prevención del cáncer cervicouterino.

Si bien es cierto existe el reconocimiento por parte de la OMS al uso de la MTC la automedicación farmacológica y tratamiento con plantas medicinales, puede implicar problemas de salud [10]. No obstante, su crecimiento en el uso está relacionado a razones económicas, al fácil acceso y a contar con menos efectos secundarios que los medicamentos a base de fármacos de síntesis química [11].

La MTC no sólo es una practicidad, arraigada en el seno de las familias, especialmente en las zonas rurales por su tradición u oralidad, sino que es usada especialmente en las zonas rurales, ante el costo de los medicamentos farmacéuticos y el acceso a los mismos.

Este estudio pretende contribuir con ampliar la frontera del conocimiento, no sólo frente a la percepción que tiene la población colombiana frente al uso y la practicidad de MTC, sino a aportar investigaciones bajo la metodología de análisis de sentimiento, del cual poco estudio se han desarrollado en el territorio nacional, al tiempo de contribuir con la Gestión del Conocimiento, Investigación e Innovación en MTAC, cuya línea está centrada en “Definir metodologías de investigación para generar conocimiento en MTAC, las cuales deben cumplir con los principios éticos adoptados a nivel nacional e internacional” [12].

En Colombia se ha venido implementando estrategias para el desarrollo de las Medicinas y las Terapias Alternativas y Complementarias, MTAC, en el marco de las leyes 1438 de 2011 y 1751 de 2015, Ley 397 de 1997 de Interculturalidad y Ley Estatutaria de Salud, con la finalidad de aportarle a la salud de los colombianos, en lo preventivo y curativo como una garantía al derecho fundamental a la salud [12].

## METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. El cálculo de la muestra se aplicó mediante la técnica de muestreo probabilístico tipo aleatorio simple, heterogeneidad del 50%, nivel de confianza 95 % y error 5 %, asumiendo una población mayor de 14 años de 37.303.816 individuos. Con estos criterios se obtuvo un tamaño muestral mínima de 385. El cuestionario fue desarrollado mediante la aplicación Google-Formularios, el cual fue validado mediante revisión de expertos y la aplicación del instrumento a 50 personas.

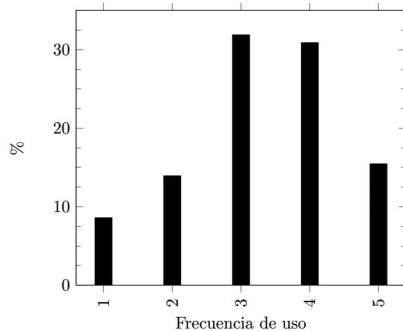
El formulario que consta de 14 preguntas recolecta información sociodemográfica como sexo, edad, nivel socioeconómico, lugar de residencia, formación académica y tipo de población (urbana/rural), e información referente, específicamente al uso de plantas medicinales y la percepción de la población frente a su uso.

Los datos se recopilaron mediante un formulario en línea de Google Drive®. El objetivo del estudio se describió a los encuestados antes del consentimiento y la participación fue completamente voluntaria.

El análisis de la información recolectada se realizó usando técnicas de Procesamiento de Lenguaje Natural (PLN), como análisis de sentimientos (AS), nube de palabras, corrección de texto y diagramas de frecuencia; este último para identificar los términos más usados por la población de estudio. Así, para el análisis de sentimientos, se utilizó el modelo “pysentimiento/robertuito-sentiment-analysis” del algoritmo “Bidireccional Encoder Representations for Transformers (BERT)”, empleando la librería Natural Language Toolki (NLTK) para eliminar, errores ortográficos, mezclas entre mayúsculas y minúsculas, y normalizar o depurar los datos con el fin de descartar todos los términos que no aportan al significado del texto. Una vez depurados los datos, se procedió a tokenizar el texto, es decir a segmentar el texto en palabras mediante NLTK, estableciendo las palabras más frecuentes para luego presentar los resultados mediante nube de palabras. Además, a partir de la métrica: **similitud del coseno** se establecen correlaciones entre los textos dados. Finalmente, mediante la API (del inglés, “Application Programming Interface”, en español, Interfaz de Programación de Aplicaciones) **pipeline** se usa el modelo **robertuito**, para establecer el análisis de sentimiento (Positivo, Neutro, Negativo) de cada una de las respuestas de los encuestados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encuestaron 561 personas (masculino 44.4%, femenino 55,6%), los rangos de edad se establecieron de acuerdo con ciclo vital propuesto por el Ministerio de Salud [12] que define que el 42% son jóvenes de entre 18 y 26 años de edad, el 55% son personas adultas de entre 27 y 59 años de edad y el 3% como personas en el ciclo vital de vejez (>60 años). En cuanto al nivel socioeconómico, el 19.4% pertenece al estrato 1, el 34,0% al estrato 2, 30,5% al estrato 3, 10,5% al estrato 4, 3.6% al estrato 5 y 2,0 al estrato 6. En cuanto a la formación académica, el 1,2% indica no tener ningún tipo de formación académica, 2,3% primaria, 33,5% Secundaria/Bachiller, 15,2% técnico, 7,3% tecnólogo, 21,6% profesional universitario, 7,3% especialistas, 10,0% maestría y 1,6% doctorado. La población encuestada en su mayoría se encuentra en zonas urbanas (84,3%). En relación al uso de plantas medicinales, el 91,4% de las personas encuestadas registran haber utilizado algún tipo de planta medicinal para el tratamiento de una patología (Figura 1).



**Figura 1.** Uso de plantas medicinales en el tratamiento de patologías (1 = Nunca, 2 = Raramente, 3 = Ocasionalmente, 4 = Frecuentemente, 5 = Siempre).

Así, el 45,8% indica que raramente u ocasionalmente utiliza PM en el tratamiento de alguna patología, y un porcentaje importante de personas (45,6%) indican que usan plantas medicinales frecuentemente/siempre, siendo siempre la respuesta más categórica en la población rural.

En relación con la opinión que tienen sobre el uso de planta medicinales (Figura 2) (Qué opinión tienen sobre el uso de planta medicinales), la mayoría de ellas son positivas (buenas, excelente, natural, buena alternativa, mejor opción, efectivas, útiles). Al realizar el análisis de sentimientos, la población rural no reporta sentimientos negativos frente al uso de plantas medicinal, entendiéndose como sentimientos negativos palabras o frases cuya intención sugiere que las plantas medicinales representan algún riesgo o no son útiles. En cuanto a la población urbana, sólo se reportan 13 sentimientos negativos de las 451 palabras que se registraron en la “bolsa de palabras”, dentro las cuales se encuentran, “tóxico”, “abuso”, “mal uso”, algunos otros sentimientos negativos están relacionados con el uso de plantas, es decir “enfermedades”, “patologías”, “malestar”, “dolor”, estas palabras que el algoritmo toma como negativas están relacionadas a frases como “útiles para el tratamiento de enfermedades”, “tratamiento del dolor”, “mejoran el malestar” por lo que en general el análisis de sentimientos muestra que las personas presentan una percepción positiva frente al uso de plantas medicinales.

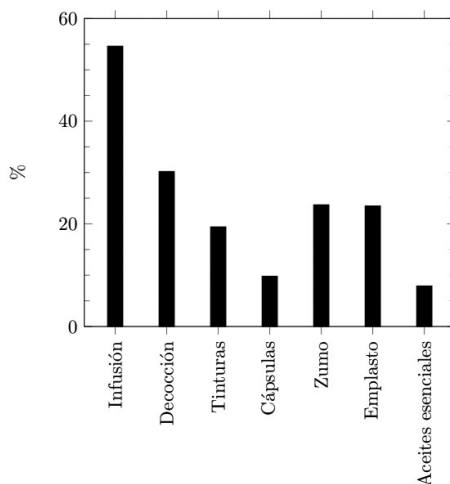
Una vez identificada la precepción de la población frente al uso de las plantas medicinales, se indagó sobre cuáles afecciones/dolencias son tratadas con plantas medicinales (Figura 3), siendo su uso principal como analgésico para el (dolor de estómago, espalda, muscular, golpes, cólicos menstruales), otros usos son antigripal (gripe), antiinflamatorios (inflamaciones, golpes), antimicrobianos (heridas, infecciones) y antidiarreicos entre otros.







en la zona afectada. Las tinturas ocupan el quinto lugar (19,4%), de acuerdo con los reportes, esta forma de administración está relacionada con el uso de hojas de Coca y Marihuana utilizadas como antiinflamatorios y analgésicos de uso tópico, propiedades registradas en la literatura [19, 24]. Finalmente, se tienen las cápsulas y los aceites esenciales, los cuales en su mayoría son reportados por personas de zonas urbanas.

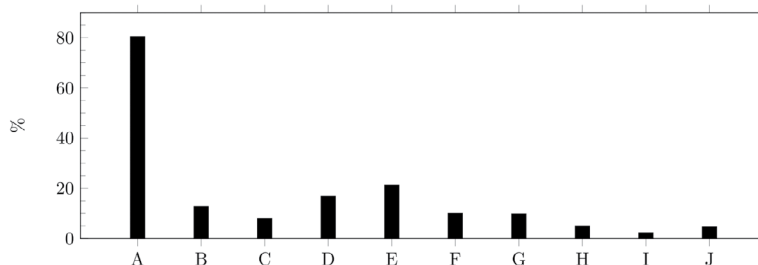


**Figura 5.** Formas de dosificación más habituales de plantas medicinales.

Al indagar las razones por las cuales se utilizaron estas plantas medicinales (Figura 6), el 80% de las personas encuestadas reportan que las recomendaciones por parte de familiares y amigos son una de las razones más importantes a la hora de consumir PM, el 20,1% indica que utiliza PM en el tratamiento de patologías definidas como no graves como resfriados, tos, golpes leves, dolor de estómago, cólicos menstruales entre otros debido a la facilidad de adquirirlas, bajo costo y seguridad. Otra de las razones, son el uso de PM como potenciadores del efecto de un fármaco (16,8%), en este caso, también se puede presentar el efecto contrario debido al desconocimiento del individuo frente los metabolitos secundarios de la PM los cuales podrían actuar como antagonistas del fármaco administrado.

Una de las razones más interesantes es la dependencia a la medicina alternativa (12,7%) que sumado a la desconfianza de la medicina tradicional (5,0%) representa un porcentaje importante de personas que posiblemente no confía en las indicaciones médicas.

Otras justificaciones son la publicidad/lectura de revistas/TV/Internet (8,0%), consejo médico (10,0%), asesoramiento de herbolario, vendedor de hierbas (9,8%), sin acceso a otro tratamiento (2,3%) y consejos del farmacéutico (4,6%).

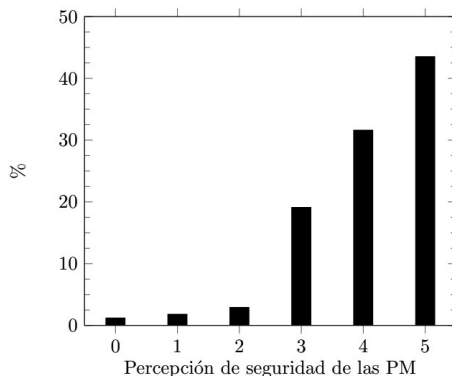


**Figura 6.** Razones por las cuales se utilizaron estas plantas medicinales (A: Consejos familiares/amigos, B: Dependencia de medicina alternativa, C: Por publicidad/lectura de revistas/TV/Internet, D: Como complemento de otros medicamentos/fármacos, E: Tratamiento de enfermedades no graves, F: Consejo médico, G: Asesoramiento de herbolario, vendedor de hierbas, H: Desconfianza en la medicina tradicional/hospitalaria, I: Sin acceso a otro tratamiento, J: Consejos del farmacéutico.

Al preguntar ¿Cómo consideran las plantas medicinales? Siendo 0=Muy peligrosas, y 5=Muy seguras (Figura 7), 43,5% de las personas encuestadas consideran que el consumo de PM es muy seguro, sin embargo esta seguridad puede conllevar al consumo inadecuado de PM, puesto que no todas son seguras y su consumo inadecuado puede conllevar a efectos adversos graves [25-27].

El 50,7% las considera seguras teniendo en cuenta algunas recomendaciones y 5,9% considera las PM como muy peligrosas o sugieren un grado de peligrosidad, esto se encuentra relacionado con experiencias negativas como el consumo de plantas medicinales para el tratamiento de patologías crónicas como diabetes, artritis en donde el consumo de plantas medicinales por del envidia acarreo deterioro en la salud del paciente.

Finalmente se indagó, sobre el cambio de la medicina tradicional a tratamientos con plantas medicinales, en donde el 45,8% de la población encuestada indica que ha cambiado los tratamientos tradicionales por el uso de plantas medicinales. Sorpresivamente se halló que el 95% de la población rural es la que ha hecho el tránsito a este cambio de tratamiento, si bien el 100% de las personas que indican haber realizado este cambio reportan resultados positivos, este comportamiento puede acarrear efectos de salud graves debido a la no adherencia terapéutica sobre todo en enfermedades crónicas [28, 29].



**Figura 7.** Percepción de seguridad de las plantas medicinales.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## CONCLUSIONES

Las Plantas medicinales en Colombia son consideradas como una de las mejores alternativas para el tratamiento de afecciones leves de salud, al tiempo son consideradas por la mayoría de los encuestados como una alternativa segura que puede reemplazar o coadyuvar a la medicina tradicional. El uso más relevante de las plantas medicinales se centra en el manejo del dolor, seguido de tratamiento de infecciones. En cuanto a la percepción de seguridad, un alto porcentaje considera a las plantas medicinales como agentes terapéuticos muy seguros.

## REFERENCIAS

1. E.L. Menéndez, Orígenes y desarrollo de la medicina tradicional: una cuestión ideológica, *Salud Colect.*, **18**, e4225 (2022). 451-466 Doi: <https://doi.org/10.18294/SC.2022.4225>

2. Organización Mundial de la Salud, *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*, Organización Mundial de la Salud, Hong Kong, 2023.
3. Organización Mundial de la Salud, Discurso de apertura del Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, Director General de la OMS, en la 75a Asamblea Mundial de la Salud - 23 de mayo de 2023, 2023. URL: <https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-address-at-the-75th-world-health-assembly---23-may-2022>, consultado el 5 de marzo de 2023.
4. H. Li, J. Liu, X. Hu, S. Wei, W. Jun, Practices, knowledge, and attitudes of Chinese university students toward traditional Chinese herbal medicine for the control of COVID-19, *Infect. Drug Resist.*, **15**, 6962 (2022). Doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S387292>
5. G.B. León-Montoya, M. Acosta-Román, M.E. Saavedra-Chinchayán, S. Almonacid-Quispe, Medicina tradicional como tratamiento de la COVID-19 en estudiantes y familiares en una universidad de la sierra del Perú, *Aten. Primaria*, **55**, 102526 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.APRIM.2022.102526>
6. M. Aboufaras, K. Selmaoui, N. Ouzennou, Efficacies and side effects of medicinal plants used by patients with cancer in Morocco: A retrospective treatment-outcome study, *J. Ethnopharmacol.*, **301**, 115-783 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2022.115783>
7. J.L. Peñarredonda, *Cómo Colombia, el segundo país con mayor biodiversidad del mundo, quiere explorar su selva tras años de guerra*, BBC, 2018. URL: <https://www.bbc.com/mundo/vert-fut-45322305>, consultado el 13 de abril de 2023.
8. A.F. Angulo, R.A. Rosero, M.S. González-Insuasti, Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia, *Univ. Salud*, **14**(2), 168-185 (2012).
9. D.C. Valoyes-Milán, L. Palacios-Palacios, Patrones de uso de las plantas medicinales en el Chocó y Cauca (Colombia), *Ciencia en Desarrollo*, **11**(2), 85-96 (2020). Doi: <https://doi.org/10.19053/01217488.V11.N2.2020.10583>
10. E.C. Núñez-Vásquez, N.J. Rodrigo-Gálvez, *Automedicación farmacológica y tratamiento con plantas medicinales utilizado para COVID-19 en adultos que acuden a Boticas Diana - Chota 2021*, Trabajo de grado, Universidad Roosevelt, Huancaayo, Perú, 2021.

11. C. Khatib, A. Nattouf, M.I.H. Agha, Traditional medicines and their common uses in central region of Syria: Hama and Homs – an ethnomedicinal survey, *Pharm. Biol.*, **59**(1), 778-788 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/13880209.2021.1936078>
12. Y. Barajas-Ortíz, J.F. Ariza-Montoya, L.E. Pino-Arango, L.P. Reyes-Sarmiento, M.C. Julio-Giraldo, R.E. Nuñez-González, I.T. Caicedo-Revelo, J.H. Cubides-Zambrano, O.L. Corredor-Nossa, Y.I. Sandoval-Gil, S.C. Narvaez-De Mejia, J. Solano-Galvis, L.H. Tocaruncho-Ariza, O.R. Flórez-Granados, E.F. Prieto-Murillo, M.I. Schotborgh, *Lineamientos técnicos para la articulación de las Medicinas y las Terapias Alternativas y Complementarias, en el marco del Sistema General de Seguridad Social en Salud*, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá D.C., 2018. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/lineamientos-mtac-sgsss.pdf>, consultado el 5 de marzo de 2023.
13. R. Pinzón, *Vademécum Colombiano de plantas medicinales*, Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 2008.
14. A.E. Al-Snafi, Medical importance of *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*) -A review, *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, **6**(2), 89-95 (2016).
15. C. Diedrich, L.D. da Silva, R. Sari, G.C. de Cristo-Borges, H.S. Muniz, V.A. de Lima, T.L.C. Oldoni, S.T. Carpes, Bioactive compounds extraction of *Croton lechleri* barks from Amazon forest using chemometrics tools, *J. King Saud Univ. - Sci.*, **33**(4), 101-416 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101416>
16. Z. Chen, R. Bertin, R. Marin, F. Medjiofack-Djeujo, G. Froldi, Effects of *Croton lechleri* sap (Sangre de Drago) on AGEs formation, LDL oxidation and oxidative stress related to vascular diseases, *Nat. Prod Res.*, **36**, 4165-4169 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960520>
17. U. Pereira, C. Garcia-Le Gal, G. Le Gal, N. Boulais, N. Lebonvallet, G. Dorange, L. Lefeuvre, A. Gougerot, L. Misery, Effects of sangre de drago in an *in vitro* model of cutaneous neurogenic inflammation, *Exp. Dermatol.*, **19**, 796-799 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.2010.01090.X>
18. V. Maida, R.B. Shi, F.G.T. Fazzari, L.M. Zomparelli, A new treatment paradigm for sickle cell disease leg ulcers: Topical cannabis-based medicines, *Exp. Dermatol.*, **30**, 291-293 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/EXD.14256>

19. C. Altinkaynak, E. Haciosmanoglu, M. Ekremoglu, M. Hacioglu, N. Özdemir, Anti-microbial, anti-oxidant and wound healing capabilities of *Aloe vera*-incorporated hybrid nanoflowers, *J. Biosci. Bioeng.*, **135**, 321-330 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2023.01.004>
20. A. Kazlagić, A. Lagumdžija, B. Borovac, S. Hamidović, O.A. Abud, E. Omanović-Miklićanin, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using fresh leaf extract of *Aloe vera* barbadensis Miller, *Aloe vera* and *Sempervivum tectorum* and its antimicrobial activity studies, en: M. Brka, E. Omanović-Miklićanin, L. Karić, V. Falan, A. Toroman (editores), *30th Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry*, AgriConf 2019, IFMBE Proceedings, vol 78, Springer, Cham. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1\\_42](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1_42)
21. A.D. Klein, N.S. Penneys, *Aloe vera*, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **18**, 714-720 (1988). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(88\)70095-X](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(88)70095-X)
22. S.E. Giraldo-Quintero, M.C. Bernal-Lizarazú, A. Morales-Robayo, A.Z. Pardo-Lobo, L. Gamba-Molano, Uso tradicional de plantas medicinales en mercados de Bogotá, D.C., *Nova*, **13**(23), 73-80 (2015).
23. M.T. López-Luengo, Formas de administración más habituales de plantas medicinales, *Offarm*, **21**(2), 122-125 (2002).
24. L.K. Blevins, A.P. Bach, R.B. Crawford, J. Zhou, J.E. Henriquez, M.D. Rizzo, S. Sermet, D.M.I.O. Khan, H. Turner, A.L. Small-Howard, N.E. Kaminski, Evaluation of the anti-inflammatory effects of selected cannabinoids and terpenes from *Cannabis Sativa* employing human primary leukocytes, *Food Chem. Toxicol.*, **170**, 113458 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2022.113458>
25. M.A. Weigelt, R. Sivamani, H. Lev-Tov, The therapeutic potential of cannabinoids for integumentary wound management, *Exp Dermatol.*, **30**, 201-211 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/EXD.14241>
26. L.M. Clemen-Pascual, R.A.S. Macahig, N.R.L. Rojas, Comparative toxicity, phytochemistry, and use of 53 Philippine medicinal plants, *Toxicol. Rep.*, **9**, 22-35 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2021.12.002>
27. H. Saleem, U. Khurshid, M.I. Tousif, S. Anwar, N.A. Awadh Ali, M.F. Mahmoodally, N. Ahemad, A comprehensive review on the botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Anagallis arvensis* (L): A wild edible medicinal food plant, *Food Biosci.*, **52**, 102328 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.102328>

28. J.J. Ortega-Cerda, D. Sánchez-Herrera, Ó.A. Rodríguez-Miranda, J.M. Ortega-Legaspi, Adherencia terapéutica: un problema de atención médica, *Acta Médica Grupo Ángeles*, **16**(3), 226-232 (2018).
29. B.R. Durán-Varela, B. Rivera-Chavira, E. Franco-Gallegos, Apego al tratamiento farmacológico en pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, *Salud Pública Méx.*, **43**(3), 233-236 (2001).

### CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.P. Ortiz, M. Trujillo-Monje, H.S. Rebolledo-Cortes, H. Rubiano-Daza, R.E. Cárdenas-Torres, D.R. Delgado, Análisis de la percepción de la población colombiana sobre uso de plantas medicinales mediante procesamiento de lenguaje natural (PLN), *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1058-1073 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110755>



## Perfil químico e atividades farmacológicas da *Punica granatum* (Punicaceae): uma revisão

Antônio Rony da Silva Pereira Rodrigues<sup>1\*</sup>, Cicero Damon Carvalho de Alencar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903, Brasil. Correio eletrônico: ronny346silva@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luíz, 1161 - Pimenta, Crato - CE, 63105-010, Brasil. Correio eletrônico: damon.alencar12@gmail.com

\*Autor correspondente

Recebido: 26 de fevereiro de 2023

Revisado: 20 de julho de 2023

Aceto: 31 de julho de 2023

### RESUMO

**Introdução:** a *Punica granatum* é objeto de estudo de múltiplos pesquisadores, pois a espécie possui compostos químicos nas folhas, raízes, cascas, suco e caule, sendo uma fonte de taninos, saponinas, polifenóis, flavonoides entre muitas outras substâncias. **Objetivo:** descrever o perfil fitoquímico e as atividades farmacológicas da *Punica granatum*. **Metodologia:** o estudo trata-se de uma revisão bibliográfica com foco em artigos publicados na última década (2013-2012), utilizando as bases de dados Scopus, Embase, Web of Science e PubMed-Medline como fontes primárias de pesquisa e utilizando o software gratuito Ryyan para análise dos estudos relevantes que integram a revisão final. **Resultados:** os estudos incluídos descrevem a romã como uma espécie rica em compostos químicos, como flavonoides, ácidos orgânicos e polifenóis. Enquanto as atividades farmacológicas, incluem atividade anti-helmíntica, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica e ações frente a prevenção e tratamento da doença de Alzheimer. **Conclusão:** a diversidade de compostos pode representar uma fonte viável para produção de fármacos e cosméticos com atividades de funções biológicas relevantes a saúde humana.

**Palavras-chave:** Romã, farmacologia, fitoquímica.

## SUMMARY

### Chemical profile and pharmacological activities of *Punica granatum* (Punicaceae): a review

**Introduction:** *Punica granatum* is the object of study by multiple researchers because the species has chemical compounds in leaves, roots, barks, juice, and stem, being a source of tannins, saponins, polyphenols, flavonoids among many other substances. **Aim:** To describe the phytochemical profile and pharmacological activities of *Punica granatum*. **Methodology:** The study is a bibliographic review focusing on articles published in the last decade (2013-2012), using the Scopus, Embase, Web of Science and PubMed-Medline databases as primary sources of research and using the free Ryyan software for analysis of the relevant studies that integrate the final review. **Results:** The included studies describe pomegranate as a species rich in chemical compounds such as flavonoids, organic acids, and polyphenols. While pharmacological activities include anthelmintic, antidiabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, anticarcinogenic activity and actions against the prevention and treatment of Alzheimer's disease. **Conclusion:** The diversity of compounds may represent a viable source to produce drugs and cosmetics with activities of biological functions relevant to human health.

**Keywords:** Pomegranate, pharmacology, phytochemistry.

## RESUMEN

### Perfil químico y actividades farmacológicas de *Punica granatum* (Punicaceae): una revisión

**Introducción:** *Punica granatum* es objeto de estudio por múltiples investigadores, pues la especie posee compuestos químicos en hojas, raíces, cortezas, jugo y tallo, siendo fuente de taninos, saponinas, polifenoles, flavonoides entre muchas otras sustancias. **Objetivo:** describir el perfil fitoquímico y las actividades farmacológicas de *Punica granatum*. **Metodología:** el estudio es una revisión bibliográfica centrada en artículos publicados en la última década (2013-2012), utilizando las bases de datos Scopus, Embase, Web of Science y PubMed-Medline como fuentes primarias de investigación y utilizando el software gratuito *Ryyan* para el análisis de los estudios relevantes que integran la revisión final. **Resultados:** los estudios incluidos describen la granada como una especie rica en compuestos químicos como flavo-

noides, ácidos orgânicos y polifenoles. Mientras que las actividades farmacológicas incluyen actividades antihelmínticas, antidiabética, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena y acciones contra la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. **Conclusión:** la diversidad de compuestos puede representar una fuente viable para la producción de medicamentos y cosméticos con actividades de funciones biológicas relevantes para la salud humana.

**Palabras clave:** Granada, farmacología, fitoquímica.

## INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* Linn.) é uma planta frutífera pertencente à família *Punicaceae*, sendo originária do Oriente Médio (na região onde se localiza o Irã, Afeganistão e o norte da Índia) [1], embora seja cultivada em todas as regiões do mundo atualmente, onde condições climáticas o permitem [2].

A romã desempenha papel importante como produto de exportação comercial, mas muito além de sua importância comercial, o fruto se tornou atraente para pesquisadores, para estudar várias características biológicas, como alta atividade antioxidante na fruta e a poli cariopse como uma característica valiosa para a produção agrícola [3].

A *P. granatum* L. são uma espécie bastante utilizada como fitoterápico na medicina popular. Na medicina popular as cascas do fruto são utilizadas no tratamento de dores de garganta e inflamações bucais, como também outras partes como as folhas, raízes, sementes e o fruto estão associados ao tratamento de úlceras, diarreia, febre, gengivite, abscessos, inflamações, aftas e outras infecções [4, 5].

Importantes componentes químicos foram descobertos e isolados dessa espécie, como taninos, flavonas nas folhas, esteróis e ácidos graxos do óleo da semente, flavonóis e alcaloides das cascas do fruto, piperidina nas raízes, ácido gálico e triterpenóides nas flores, além de apresentar altas concentrações de vitamina C e B nos frutos. Os componentes de *P. granatum* L. estão distribuídos por toda a planta [6].

A *P. granatum* L., se trata de uma planta rica em compostos fenólicos que lhe atribuem algumas das atividades farmacológicas. Em 2017, Hmid *et al.* [7] demonstrou em seu estudo a presença de 10 compostos fenólicos no suco de romã, sendo eles: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido elágico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, cloridzina e rutina.

Estudo experimentais em laboratório e em modelos animais demonstram que os componentes fitoquímicos da *P. granatum* L., podem atuar como ativos antioxidantes [8, 9], anti-artríticos [10], anticoccidial [11], antimicrobiano [12], antiplaquetários [13], antiangiogênicos [14], antidepressivos [15] e anti-quorum [16]. Devido as características químicas e relevância etnomédica, o extrato de cascas de *P. granatum* L., são propostos como substituintes aos aditivos alimentares sintéticos, como nutracêuticos e quimiopreventivos, mas devido a sua adstringência e propriedades antinutricionais, não aplicados ainda como ingredientes alimentícios [17].

A ampliação dos conhecimentos dos usos tradicionais e a caracterizações biológicas dos componentes químicos presentes nas diversas partes da *P. granatum* L., são essenciais. Este trabalho busca fornecer dados sobre a composição fitoquímica e atividade farmacológica da *Punica granatum* L., para promover uma base para o desenvolvimento de novos estudos acerca da espécie.

## METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica relacionada a espécie *Punica granatum* L., a fim de reunir informações relevantes sobre o perfil fitoquímico e atividades farmacológicas. Fontes primárias de pesquisa foram utilizadas, incluindo Scopus, Embase, Web of Science e PubMed - Medline. Os artigos de literatura publicados entre 2013 e 2023 foram incluídos para serem analisados, com objetivo de integrar a revisão. Para a busca nas fontes de pesquisa, foram utilizados os termos: “*Punica granatum* L.”, “Atividade farmacológico” e “Perfil químico”. Os artigos obtidos foram dispostos no software *Ryyan* (<https://www.ryyan.ai/>), para remover artigos fora da temática do estudo ou artigos duplicados.

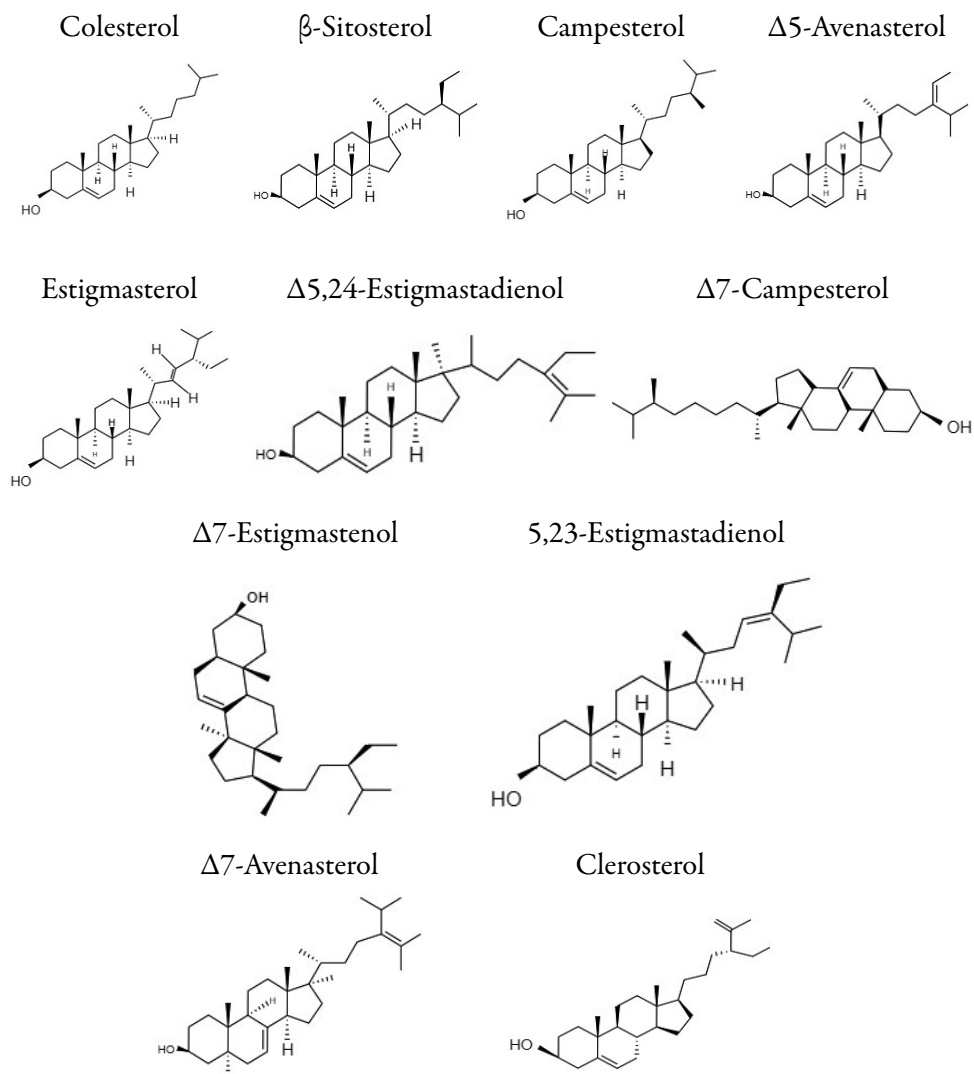
Entre os dados extraídos incluem atividades farmacológica, compostos fitoquímicos presentes na *P. granatum* e compostos que desempenham ações farmacológica. Todas as estruturas químicas foram desenhadas utilizando o software *ChemDraw* 17.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

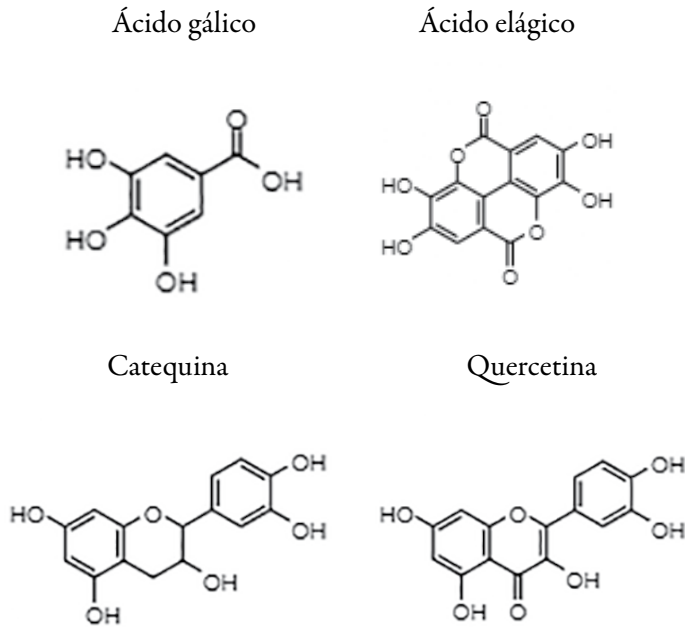
### Fitoquímica

A literatura moderna descreve que os extratos de diferentes partes da *Punica granatum* Linn. apresentam compostos fitoquímicos com destaque a presença de carboidratos e triterpenos, tendo como componentes majoritários esteróis, compostos fenólicos, alcaloides, ácidos graxos e flavonoides [18]. Outros estudos relatam a presença de saponi-

nas, que estão relacionadas a ação de proteção gástrica [19, 20]. Nos últimos cinco anos, muitos estudos foram realizados com objetivo de identificar e estudar os compostos químicos presentes na *Punica granatum* Linn. Nos resultados da pesquisa foram identificados a presença de compostos químicos, no óleo da semente foi observado a presença de 11 esteróis (Fig. 1), na casca a presença de ácido gálico, ácido elágico, catequina e quercetina (Fig. 2).



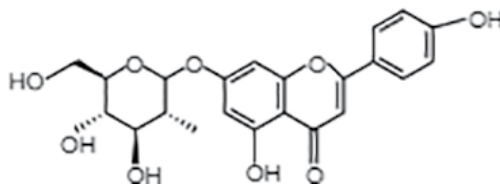
**Figura 1.** Estrutura química dos esteróis presente no óleo da semente de *P. granatum*. Fonte: Os autores, 2023.

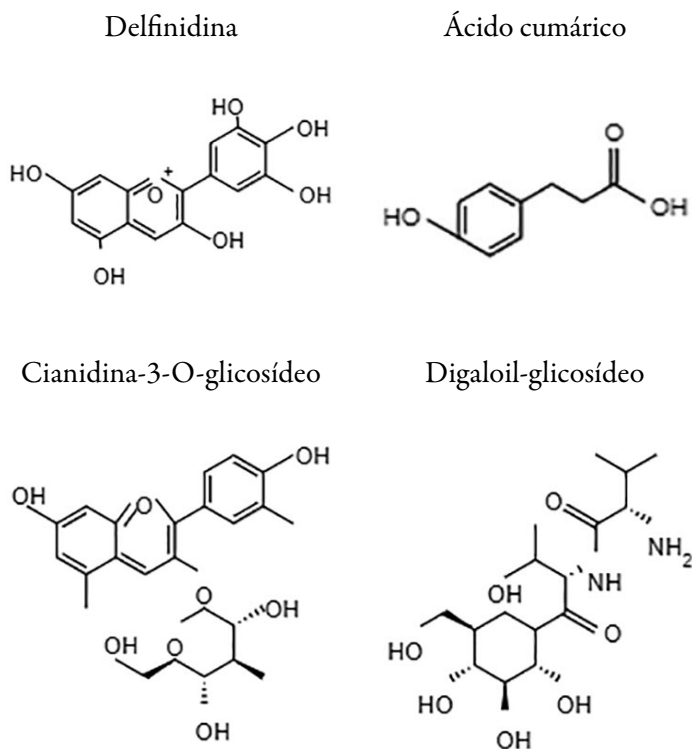


**Figura 2.** Compostos identificados nas cascas de *P. granatum*. Fonte: Os autores, 2023.

Foram identificados 50 compostos químicos majoritários, estando distribuídos nas flores, cascas, sementes, suco e folhas. As estruturas químicas dos principais componentes estão dispostas na Figura 3.

Apigenina 7-O-glicosídeo





**Figura 3:** Compostos identificados com frequência na *P. granatum*. Fonte: Os autores, 2023.

Um resumo sobre os principais compostos fitoquímicos, a peça vegetal e a referência de origem são dadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais componentes químicos da *Punica granatum* descritos na literatura.

N.	Composto	Fórmula molecular	Parte usada	Referência
1	Apigenina 7-O-glicosídeo	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Folhas	[21]
2	Astragalina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Sementes	[22]
3	Campesterol	$C_{28}H_{48}O$	Sementes	[9]
4	Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	Cascas	[23]
5	Colesterol	$C_{27}H_{46}O$	Sementes	[9]
6	Clerosterol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
7	Ácido cumárico	$C_9H_8O_3$	Cascas	[16]

N.	Composto	Fórmula molecular	Parte usada	Referência
8	Cianidina-O-pentosídeo-glicosídeo	$C_{26}H_{27}O_{15}$	Sucos e sementes	[24]
9	Cianidina-3-O-(6"-acetyl)-glicosídeo	$C_{23}H_{23}O_{12}$	Flor	[25]
10	Cianidina-3-O-glicosídeo	-	Cascas e Folhas	[26]
11	Ácido elágico	$C_{14}H_6O_8$	Casca	[23]
12	Delfinidina	$C_{15}H_{11}O_7$	Folhas	[27]
13	Digaloil-HHDP-glicosídeo	-	Folhas, Suco, Sementes	[28, 29]
14	Digaloil-glicosídeo	-	Flores, sementes e cascas	[28-30]
15	Dihidromiricetina	$C_{15}H_{12}O_8$	Sementes	[22]
16	Elagitanino		Suco	[31]
17	Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	Casca	[23]
18	Granatina A derivado do ácido elágico	-	Cascas	[31]
19	Galoil-Di-HHDP-glicosídeo	-	Cascas	[28]
20	Galoil-glucosídeo	$C_{20}H_{20}O_{14}$	Flores, sementes, cascas e sucos	[29]
21	Galoil-galagil-glicosídeo	$C_{41}H_{26}O_{26}$	Flores, Cascas e Suco	[28, 29]
22	Galoil-HHDP-glicosídeo	$C_{27}H_{22}O_{17}$	Folhas, cascas, suco, folhas	[28, 30]
23	Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$	Cascas	[23]
24	HHDP-glicosídeo	$C_{20}H_{18}O_{14}$	Folhas, Suco, Cascas	[28, 30, 32]
25	Hipomanina A	$C_{27}H_{22}O_{18}$	Folhas, Cascas e Suco	[32]
26	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	Folhas	[32]
27	Luteolina-4'-O-glicosídeo	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Folhas	[33]
28	Naringetol	$C_{15}H_{12}O_5$	Sementes	[22]
29	Ácido oleanólico	$C_{30}H_{48}O_3$	Folhas	[21]



N.	Composto	Fórmula molecular	Parte usada	Referência
30	Punicalin $\alpha$ / $\beta$	$C_{34}H_{22}O_{22}$	Flores, casca, suco e sementes	[25]
31	Pelargonidina3-O-sophorose	$C_{27}H_{31}O_{15}$	Flor	[31]
32	Pelargonidin-3-O-pentoside-5-O-glucoside	$C_{26}H_{29}O_{14}$	Suco	[32]
33	Pomelataninos	-	Cascas e flores	[28]
34	Dímero de procianidina	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Folhas	[34]
35	Punicalagina	$C_{48}H_{28}O_{30}$	Cascas	[35]
36	Punicalagina $\beta$ /HHDGalagil-glicosídeo	$C_{48}H_{28}O_{30}$	Flores e cascas	[34]
37	Punicataninos A	$C_{43}H_{34}O_{28}$	Cascas e suco	[28, 36]
38	Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	Cascas	[23]
39	Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Folhas	[34]
40	Rutina tri-hidratada	$C_{27}H_{36}O_{19}$	Sementes	[37]
41	Estigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
42	$\beta$ -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	Sementes	[9]
43	1,3,4-Tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose	$C_{27}H_{24}O_{18}$	Flor	[30]
44	6-O-galoil- $\beta$ -d-glicose	$C_{13}H_{16}O_{10}$	Suco	[28]
45	$\Delta^5$ -Avenasterol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
46	$\Delta^5,23$ -Estigmastadienol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
47	$\Delta^5,24$ -Estigmastadienol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
48	$\Delta^7$ -Avenasterol	$C_{29}H_{48}O$	Sementes	[9]
49	$\Delta^7$ -Campesterol	$C_{28}H_{48}O$	Sementes	[9]
50	$\Delta^7$ -Estigmastenol	$C_{29}H_{50}O$	Sementes	[9]

Fonte: Os autores, 2023.

## FARMACOLOGIA

### Atividade anti-helmíntica

Ahmed *et al.* [38] identificou a atividade anti-helmíntica da *Punica granatum* em seus estudos, utilizando extratos metanoicos das cascas e raízes da planta frente ao parasita *Haemonchus contortus*. Os extratos de *P. granatum* produziu atividade anti-helmíntica

significativa e semelhante ao agente anti-helmíntico, albendazol. A atividade antihelmíntica aumentou durante o passar das horas, após 7 horas de exposição à concentração de  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extratos produziu mortalidade significativa ( $p < 0,05$ ).

Castagna *et al.* [39] avaliou o potencial anti-helmíntico dos frutos da *Punica granatum*, frente a nematóides gastrointestinais em ovinos, inserindo o fruto na alimentação dos animais e avaliando os resultados através do teste de contagem de ovos fecais (FECRt). O uso do macerado de romã demonstrou redução dos ovos fecais em 50% nos primeiros 7 dias, Kaiaty *et al.* [40] também avaliou o potencial anti-helmíntico da inserção de romã na alimentação e através da contagem de ovos fecais, utilizando  $200 \text{ mg/kg}$  por peso corporal, e os resultados demonstraram redução de 85% na quantidade de ovos fecais em bovinos, ovinos, caprinos e bufalinos.

### Atividade antioxidante

Arkoub *et al.* [8] avaliou a capacidade antioxidante *in vivo* do suco e extrato aquoso das cascas da *Punica granatum* em ratos Wistar. Os grupos de estudo foram divididos em grupo controle (C), grupo utilizando Tolueno 99,5% (T), grupo utilizando extrato da casca (PB), grupo utilizando suco da romã (PJ), grupo utilizando suco e Tol (PJ-Tol) e grupo utilizando extrato de cascas e Tol (PB-Tol). A exposição dos ratos a Tolueno foi identificada a atividade hepática do grupo GSH e GPx (Glutathione Peroxidase), enquanto o grupo PB, restaurou a atividade antioxidante quando comparado ao grupo exposto ao Tolueno. A suplementação dos extratos de cascas e suco da *Punica granatum*, possibilitou a restauração da deterioração dos tecidos danificados pelo Tol. Uma melhora significativa foi identificada nos animais expostos ao grupo PB-Tol, quando comparado ao grupo PJ-Tol, que está relacionado a maior presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, que foram identificados nas cascas pelo autor através do teste de eliminação de DPPH.

Estudos de Khemakhem *et al.* [9] concluíram que a *Punica granatum* apresenta atividade antioxidante devido à alta concentração de polifenóis e flavonoides. A avaliando os extratos da semente da romã, foi identificado  $58,59 \pm 0,92 \text{ mg/g}$  de extrato de polifenóis totais,  $2,31 \pm 0,25 \text{ mg/g}$  de extrato de flavonoides, também demonstrando curva de dose-resposta graduada (EC50) no teste de DPPH de  $0,30 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e atividade antioxidante de  $19,47 \pm 0,99 \text{ mg/g}$  de extrato de semente de romã.

Estudo experimental analisou a capacidade antioxidante da *Punica granatum*, através do método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico), sendo constituído pela solução ABTS e persulfato de potássio, para avaliação da atividade antioxidante a solução ABTS foi diluída em solução tampão de pH 7,4. No estudo foi usado os extratos da casca, flores, suco, folhas e óleo das sementes e como controle positivo

o ácido ascórbico. Os testes demonstraram CE50 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de  $1,5\pm 0,08$ ,  $0,7\pm 0,01$ ,  $2,2\pm 0,2$ ,  $2,2\pm 0,15$  e  $3,0\pm 0,3$ , para cascas, folhas, flores, suco e óleo da semente, respectivamente, enquanto o controle positivo de ácido ascórbico apresentou CE50 de  $1,4\pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o que demonstra a atividade antioxidante da *Punica granatum* maior que a do ácido ascórbico, que é utilizado atualmente como agente antioxidante [13].

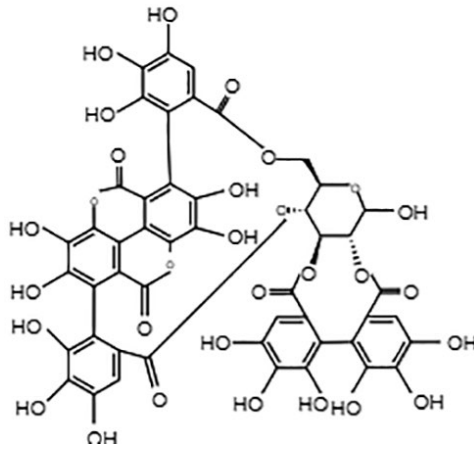
Cervantes-Anaya *et al.* [15] observou em testes o potencial antioxidante da *Punica granatum* na peroxidação lipídica cerebral em ratos *Wistar*. As ratas passaram por processo de ovariectomia e incubação pelos agentes pró-oxidantes  $\text{FeSO}_4$  ( $5 \mu\text{M}$ ) e ONOO- ( $25 \mu\text{M}$ ). Foi observado que homogenatos cerebrais expostos *ex vivo* a pro-oxidantes aumentaram a formação de espécies reativas a oxigênio (ROS), enquanto os homogenatos cerebrais expostos ao extrato aquoso ( $1,0 \text{ mg/kg}$ , 14 dias) de *Punica granatum* não foi observado produção de ROS, indicando que o extrato impediu a ação dos agentes pró-oxidantes.

#### Atividade anti-inflamatória

Rakhshandeh *et al.* [14] identificou a ação anti-inflamatória do óleo da semente de *Punica granatum*, em ratos *Wistar* machos após procedimento cirúrgico na cavidade abdominal com indução de adesão peritoneal e com tratamento de 0,5, 1,5 ou 4,5% v/v de PSO (Óleo de semente de romã). Para medir os marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) foi utilizado os kits ELISA comerciais, determinados no fluido de lavagem peritoneal. A concentração de 0,5% v/v de PSO, diminuiu os níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$  em comparação ao grupo controle. Os níveis de TNF -  $\alpha$  também caíram para as concentrações de 0,5, 1,5 e 4,5% v/v de PSO com valores de  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente.

Estudos avaliando a atividade anti-inflamatória da punicalagina (Fig. 4), um polifenol presente no fruto da *Punica granatum*, em modelos vivos identificou que o tratamento com dosagem de 5 – 40  $\mu\text{M}$ , resulta em uma redução significativa nos níveis do marcador inflamatório TNF- $\alpha$  em células de micróglia. Os resultando também mostraram supressão dos níveis de IL-6 em todas as concentrações de punicalagina testadas [41].

Tang *et al.* [42] avaliou a ação anti-inflamatória da punicalagina com objetivo de buscar um ativo para o tratamento da psoríase, uma doença cutânea inflamatória crônica. Os resultados revelaram que punicalagina provoca efeito modulatório na fosforilação de p65 (Ser536) *in vitro*. As citocinas IL-17A e TNF- $\alpha$  acarreta aumento a fosforilação de p65, enquanto a punicalagina reduz a fosforilação. O tratamento com punicalagina (2,5/5/10/20  $\mu\text{M}$ ) pode atuar como bloqueador dá a translocação nuclear induzida por TNF- $\alpha$  e IL-17A, principais citocinas da patogênese da psoríase.



**Figura 4:** Estrutura química da punicalagina. Fonte: Os autores, 2023.

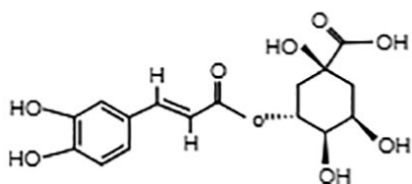
#### Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana conjunta de extratos de *Punica granatum* e nanopartículas de prata (Ag) foram estudadas frente as espécies fúngicas e bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Candida albicans*, e *Legionella pneumophila sub sp. pneumophila* (OATCC 33152). A atividade antimicrobiana foi determinada através do método de microdiluição do caldo. Os extratos de *Punica granatum*/Ag sintetizados demonstraram concentração inibitória mínima (MIC) de 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e 512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para *E. hirae*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, e *C. albicans*, respectivamente. Apresentando efeito inibitório mais baixos para microrganismo gram-negativos e maiores valores para gram-positivos [43].

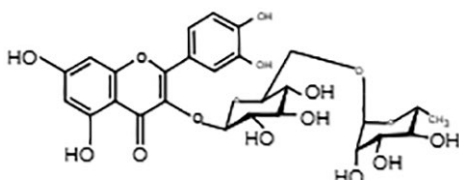
Outros autores avaliaram o potencial antimicrobiano dos extratos da romã frente a espécies bacterianas resistentes a medicamentos. Foram abordadas no estudo as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos foram avaliados em quatro concentrações, 25, 50, 100 e 200%. Entre os microrganismos estudados, o que mais apresentou inibição quando exposto aos extratos de *P. granatum* foi a *Staphylococcus aureus* ( $p \geq 0,912$ ), seguido por *Klebsiella pneumoniae* ( $p \geq 0,686$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $p \geq 0,561$ ) e *Enterococcus faecalis* ( $p \geq 0,220$ ). Entre os extratos, a concentração de 100% apresentou as maiores taxas de inibição para todas as espécies [44].

Hamrita *et al.* [16] identificou que o extrato metanoico de romã atua como agente anti-fúngico, no estudo foi utilizado cepa de *Candida albicans* (ATCC 2019) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), sobre dosagem de extrato de 50 mg·mL<sup>-1</sup>, 150 mg·mL<sup>-1</sup>, 300 mg·mL<sup>-1</sup> e grupo teste exposto a ampicilina (10 mg·mL<sup>-1</sup>). Para *C. albicans* todas as dosagens e ampicilina apresentaram zona de inibição de 6±0, enquanto para *C. parapsilosis* apresentaram zona de inibição de 28,66±1.15, 29,33±0.57, 29,66±0,57 e 11,33±1,15, para dosagem de 50, 150, 300 mg·mL<sup>-1</sup> e ampicilina (10 mg·mL<sup>-1</sup>). A ação fúngica pode estar relacionada a presença elevada de ácido clorogênico (34,028 mg/g), rutina (26,05 mg/g), epicatequina (12,207 mg/g) nos extratos metanoicos de romã.

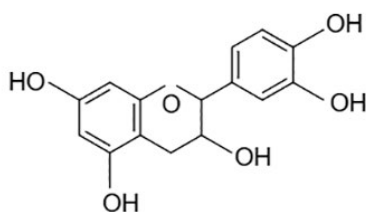
### Ácido clorogênico



### Rutina



### Epicatequina



**Figura 5:** Estrutura dos compostos descritos com atividade antifúngica. Fonte: Os autores, 2023.

A presença de compostos fenólicos e flavonoides em extratos de casca da *Punica granatum* podem justificar a atividade antimicrobiana da espécie. Leesombun *et al.* [45] identificou 574,64 mg/g de ácido gálico e 52,98 mg/g de quercetina em extratos etanoicos de cascas de romã. O autor também identificou que a presença desses compostos

provoca a ação bacteriana frente as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. Os extratos de romã demonstraram concentração inibitória mínima de 6,25, 1,56 e 1,56 mg·mL<sup>-1</sup>, para *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. enteritidis* (ATCC 13076), respectivamente.

### Atividade antidiabética

Avaliando o extrato de acetato de etila das cascas de *Punica granatum* frente as enzimas  $\alpha$ -amilase, lipase e  $\alpha$ -glucosidase *in vitro* por ensaios espectrofotométricos com leitor de microplacas e acarbose e orlistato como inibidor padrão, Di Sotto *et al.* [46] identificou que os extratos de romã podem combater o estresse oxidativo e glicativo associado à hiperglicemia por mecanismos pleiotrópicos, podendo atuar como inibidor de enzimas glicolíticas e afetar a formação de produtos finais de glicação, devido a presença de compostos fenólicos presentes na espécie.

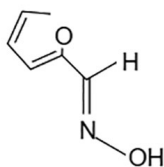
Estudos recentes demonstram que a punicalagina presente na romã pode atuar como agente antidiabético em diabetes do tipo II. A indução de diabetes do tipo II em ratos através de dieta rica em gordura e injeções de estreptozotocina, utilizando punicalagina por gavagem oral por 4 semanas demonstrou que a substância pode regular 24 biomarcadores, além de demonstrar alterações patológicas no fígado e nos rins, reduzindo a gluconeogênese e aumento da glicogênese, como também efeito positivo células HepG2 induzidas por glucosamina [47].

### Atividade anticarcinogênica

Muitos pesquisadores têm voltado suas pesquisas para desenvolver fármacos para o tratamento de câncer, por ser uma das patologias que mais causam óbitos em todo o mundo. O estudo de bioativos oriundos de plantas e microrganismos estão em destaque nos estudos para o tratamento de câncer, entre os destaques está a *Punica granatum*, por ser uma espécie rica em compostos fitoquímicos de interesse global.

Avaliando a propriedade anticancerígena do extrato etanólico da casca de *P. granatum* L. através do ensaio MTT utilizando a linha celular de câncer KB 3-1, linha celular comumente associada ao câncer bucal. 0,1 mL de linha celular KB 3-1 (1,5 × 10<sup>6</sup> células/poço), foram semeadas em placa ELISA e incubadas por 24 horas. Após 24 horas foram tratadas com extrato de *P. granatum* em concentrações de 50 µg·mL<sup>-1</sup>, 100 µg·mL<sup>-1</sup>, 150 µg·mL<sup>-1</sup>, 200 µg·mL<sup>-1</sup>, 250 µg·mL<sup>-1</sup>, 300 µg·mL<sup>-1</sup> e 350 µg·mL<sup>-1</sup>. As taxas marcaram níveis de 23,36, 27,25, 32,09, 49,55, 61,94, 71,85 e 80,88%, para as concentrações de 50 µg·mL<sup>-1</sup>, 100 µg·mL<sup>-1</sup>, 150 µg·mL<sup>-1</sup>, 200 µg·mL<sup>-1</sup>, 250 µg·mL<sup>-1</sup>, 300 µg·mL<sup>-1</sup> e 350 µg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que a inibição da linha

celular aumenta com o aumento da concentração do extrato [48]. Os autores relatam que a presença de importantes compostos químicos como o 2-furancarboxaldeído (Fig. 6), justifica a ação anticarcinogênica.



**Figura 6:** Estrutura química do 2-Furancarboxaldeído. Fonte: Os autores, 2023.

Outros estudos relatam a atividade antitumoral do extrato etanólico de cascas de *Punica granatum*. O extrato de casca frente a linhas celular de câncer hepático (HepG2) demonstraram que a atividade da glutationa peroxidase (GPx) foram reduzidas ( $p < 0,05$ ) em 77,16%, 87,35% e 71,05% na linhagem celular a 100, 200 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato, respectivamente [49]. Em carcinogênese hepatocelular induzido por injeções intraperitoneais de dietilnitrosamina em ratos Wistar machos adultos foi observado que a aplicação de punicalaginas obtidas da romã por via oral aumentou a atividade de superóxido dismutase e regulação positiva significativa na expressão de caspase-3 e Bax mRNA [50].

Testes *in vitro* utilizando *Punica granatum* de coloração vermelha, rosa e branca buscou avaliar a citotoxicidade frente a linhagens celulares carcinogênicas de mama (MDA-MB-231; HTB-26TM), adenocarcinomas alveolares (A549; CCL-185TM), colorretais tipo II de Duke (LS180; CL-187TM) e carcinoma ductal da mama (T-47D; HTB-133TM). Todos os extratos hidroalcoólicos demonstraram atividade ( $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nas linhagens testadas. Além de promover crescimento em linhagem celular de retinal humano normal (ARPE-19; CRL-2302TM) [51].

Estudos preliminares demonstraram que o extrato da casca da romã é rico de polifenóis, tendo como principais polifenóis a punicalagina  $\alpha$ ,  $\beta$  e ácido elágico e esses compostos foram avaliados como agentes anticancerígenos frente as linhagens celulares AGS (adenocarcinoma gástrico humano) e A549 (carcinoma pulmonar humano). Extratos enriquecidos com resina aniônica, na concentração mais alta de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  demonstrou resultados significativos na perda de viabilidade em células de carcinoma gástrico, atingindo cerca de 75%. Na linha A549 essa perdeu chegou aos 50%, isso se dá a alta presença de polifenóis nos extratos enriquecidos [52].

### Outras atividades farmacológicas

Estudos relatam que a romã pode atuar como um possível tratamento a doença de Alzheimer. A presença de ácido galágico, castalagina, delfinidina, cianidina, punicalina e vescalagina exibiram potente atividade inibidora da Beta-secretase 1 (BACE1), com IC<sub>50</sub> valores de 1,29±0,15, 5,12±0,18, 3,99±0,17, 5,29±0,21, 5,98±0,21 e 6,18 positivo, com um IC<sub>50</sub> valor de 9,38±1,44 µM. A hidroxilação nas posições C3, C5 e C3', bem como na posição C5', aumentam a atividade inibidora de Butirilcolinesterase (BChE), esses compostos demonstraram bioatividade promissora para produção de biofármacos para o tratamento da doença de Alzheimer [53].

## CONCLUSÕES

A abundância de compostos fitoquímicos presentes nas folhas, sementes, raízes, frutos e casca da *Punica granatum*, torna essa espécie uma importante espécie vegetal para estudos, nas mais diversas áreas das ciências químicas, biológicas e farmacêuticas. A diversidade de substâncias químicas permite que a romã possua potencial medicinal no tratamento de doenças fúngicas, inflamatórias, bacterianas, no tratamento de doenças provocadas por parasitas helmínticos, possível atividade no tratamento de câncer e doença de Alzheimer, além de alta capacidade antioxidante, podendo ser aplicada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

A *Punica granatum* representa é uma espécie de interesse científico e econômico de sumo valor, por representar uma alternativa para produção de produtos bioativos de valor comercial e químico imensurável. A ampliação de estudos sobre o uso da *Punica granatum* e seus ativos químicos deve é essencial para o desenvolvimento de novas tecnologias que podem beneficiar a saúde humana e animal.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. A. Doostkam, S. Bassiri-Jahromi, K. Iravani. *Punica granatum* with multiple effects in chronic diseases, *Int. J. Fruit Sci.*, **20**(3), 471-494 (2020), Doi: <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1653809>



2. C. Liu, X. Zhao, J. Yan, Z. Yuan, M. Gu. Effects of salt stress on growth, photosynthesis, and mineral nutrients of 18 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars, *Agronomy*, **10**(1), 27 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy10010027>
3. Z. Yuan, Y. Fang, T. Zhang, Z. Fei, F. Han, C. Liu, M. Liu, W. Xiao, W. Zhang, S. Wu, M. Zhang, Y. Ju, H. Xu, H. Dai, Y. Liu, Y. Chen, L. Wang, J. Zhou, D. Guan, M. Yan, Y. Xia, X. Huang, D. Liu, H. Wei, H. Zheng, The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology, *Plant Biotechnol. J.*, **16**(7), 1363-1374 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/pbi.12875>
4. M.H.C. Catão, M.S.P. Silva, A.D.L. Silva, R.O. Costa, Estudos clínicos com plantas medicinais no tratamento de afecções bucais: uma revisão de literatura, *J. Health Sci. Res.*, **14**(4), 279-285 (2012). Doi: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p>
5. C.R.G Torres, C.H. Cubo, A.A. Anido, J.R. Rodrigues. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. *Braz. Dental J.*, **3**(2), 43-52 (2000). Doi: <https://doi.org/10.14295/bds.2000.v3i2.87>
6. S.S. Dahham, M.N. Ali, H. Tabassum, M. Khan. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica Granatum* L.), *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, **9**(3), 273-281 (2010).
7. I. Hmid, D. Elothmani, H. Hanine, A. Oukabli, E. Mehinagic, Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco, *Arab. J. Chem.*, **10**(2), 2675-2684 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.011>
8. F.Z. Arkoub, L. Hamdi, L. Kahalerras, M. Hamoudi, K. Khelili, Evaluation of the in vitro and in vivo antioxidant potential of *Punica granatum* L. against toluene-induced liver injuries in rats, *Vet. World*, **15**(2), 374-382 (2020). Doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.374-382>
9. M. Khemakhem, Y. Zarroug, K. Jabou, S. Selmi, N. Bouzouita, Physicochemical characterization of oil, antioxidant potential, and phenolic profile of seeds isolated from Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, *J. Food Sci.*, **86**(3), 852-859 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15636>

10. P.K. Dixit, K. Nagarajan, Pharmacological and biochemical evaluation of anti-arthritic activity of *Justicia gendarussa* extract in FCA induced arthritis in Wistar rats, *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, **12**, 1699-1708 (2021). Doi: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v12i3.4769>
11. M. Han, W. Hu, T. Chen, H. Guo, J. Zhu, F. Chen, Anticoccidial activity of natural plants extracts mixture against *Eimeria tenella*: An *in vitro* and *in vivo* study, *Front. Vet. Sci.*, **9**, 1066543 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1066543>
12. M.R. Franzolin, D.D.S. Courrol, F.R.D.O. Silva, L.C. Courrol, Antimicrobial activity of silver and gold nanoparticles prepared by photoreduction process with leaves and fruit extracts of *Plinia cauliflora* and *Punica granatum*, *Molecules*, **27**(20), 6860 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27206860>
13. Z. Amri, I.B. Amor, A. Zarrouk, R. Chaaba, J. Gargouri, M. Hammami, S. Hammami, Anti-glycation, antiplatelet and antioxidant effects of different pomegranate parts, *BMC Complement. Med. Ther.*, **22**(1), 339 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03824-6>
14. H. Rakhshandeh, V. Baradaran-Rahimi, Z. Habibi, Z. Sirousi, V.R. Askari, *Punica granatum* seed oil detracts peritoneal adhesion: Perusing antioxidant, anti-inflammatory, antifibrotic, and antiangiogenic impacts, *Physiol. Rep.*, **10**(24), e15545 (2022). Doi: <https://doi.org/10.14814/phy2.15545>
15. N. Cervantes-Anaya, G. Azpilcueta-Morales, E. Estrada-Camarena, D.R. Ortega, V.P. de la Cruz, M.E. González-Trujano, C. López-Rubalcava, Pomegranate and its components, punicalagin and ellagic acid, promote antidepressant, antioxidant, and free radical-scavenging activity in ovariectomized rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 836681 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.836681>
16. B. Hamrita, E. Noumi, F. Hafi, F. Nazzaro, M. Snoussi, Phytochemical composition and antimicrobial, and anti-quorum sensing activities of *Punica granatum* L. methanolic extract, *Iran. J. Microbiol.*, **14**(3), 373-382 (2022). Doi: <https://doi.org/10.18502/ijm.v14i3.9778>
17. S. Akhtar, T. Ismail, D. Fraternali, P. Sestili, Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features, *Food Chem.*, **174**, 417-425 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>

18. K.A. Abo-Elyousr, A.D. Al-Qurashi, M. Saad, O.H. Ibrahim, M.A.A. Mousa, Efficacy of *Azadirachta indica* and *Punica granatum* extracts in the control of *Cuminum cyminum* Wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cumini*, *Sustainability*, **14**(22), 15233 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/su142215233>
19. K.B. Ajaikumar, M. Asheef, B.H. Babu, J. Padikkala, The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract, *J. Ethnopharmacol.*, **96**(1-2), 171-176 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.007>
20. Z. Shi, X. Long, Y. Li, J. Jin, J. Li, C. Yuan, R. Jin, Protective effect of tea saponins on alcohol-induced gastric mucosal injury in mice, *ACS Omega*, **8**(1), 673-681 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05880>
21. S. Wu, L. Tian, Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*), *Molecules*, **22**(10), 1606 (2017). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22101606>
22. G. Li, M. Chen, J. Chen, Y. Shang, X. Lian, P. Wang, Q. Ma, Chemical composition analysis of pomegranate seeds based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **187**, 113357 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113357>
23. G.T. Vidyavathi, B.V. Kumar, A.V. Raghu, T. Aravinda, U. Hani, H.A. Murthy, A.H. Shridhar, *Punica granatum* pericarp extract catalyzed green chemistry approach for synthesizing novel ligand and its metal (II) complexes: Molecular docking/DNA interactions, *J. Mol. Struct.*, **1249**, 131-656 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131656>
24. B. Fellah, M. Bannour, G. Rocchetti, L. Lucini, A. Ferchichi, Phenolic profiling and antioxidant capacity in flowers, leaves and peels of Tunisian cultivars of *Punica granatum* L, *Food Sci. Technol.*, **55**, 3606-3615 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3286-8>
25. N. Swilam, K.A. Nematallah, Polyphenols profile of pomegranate leaves and their role in green synthesis of silver nanoparticles, *Sci Rep.*, **10**(1), 148-159 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71847-5>

26. M. Fourati, S. Smaoui, H. Hlima, K. Elhadef, O. Braïek, K. Ennouri, A.C. Mti-baa, L. Mellouli, Bioactive compounds and pharmacological potential of pomegranate (*Punica granatum*) seeds - a review, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **75**, 477-486 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00863-7>
27. A. Topalović, M. Knežević, L. Ivanović, S. Gačnik, M. Mikulic-Petkovsek, Phytochemical screening of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from the market, *J. Food Compos.*, **100**, 103933 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103933>
28. Y. Liu, N.P. Seeram, Liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry for comprehensive phenolic characterization of pomegranate fruit and flower extracts used as ingredients in botanical dietary supplements, *J. Sep. Sci.*, **41**(15), 3022-3033 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201800480>
29. E. Hernández-Corroto, M.L. Marina, M.C. García, Extraction and identification by high resolution mass spectrometry of bioactive substances in different extracts obtained from pomegranate peel, *J. Chromatogr. A.*, **1594**, 82-92 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.018>
30. Z. Yisimayili, R. Abdulla, Q. Tian, Y. Wang, M. Chen, Z. Sun, C. Huang, A comprehensive study of pomegranate flowers polyphenols and metabolites in rat biological samples by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **1604**, 460472 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460472>
31. R. Kachkoul, T.S. Houssaini, M. Mohim, R. Habbani, A. Lahrichi, Chemical compounds identification and antioxidant and calcium oxalate anticrystallization activities of *Punica granatum* L., *Evid Based Complement. Alternat. Med.*, **2020**, 9424510 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1155/2020/9424510>
32. I.F. Pérez-Ramírez, R. Reynoso-Camacho, F. Saura-Calixto, J. Pérez-Jiménez, Comprehensive Characterization of extractable and nonextractable phenolic compounds by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization–quadrupole time-of-flight of a grape/pomegranate pomace dietary supplement, *J. Agric. Food Chem.*, **66**(3), 661-673 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05901>
33. D.P.K. Anjali, J. Sahoo, Pharmacognostical and pharmacological activity of *Punica Granatum* (Pomegranate): An overview, *Int. J. Pharm. Sci.*, **11**(3), 4695–4704 (2020). Doi: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i3.2758>

34. R. Abdulla, S. Mansur, H. Lai, A. Ubul, G. Sun, G. Huang, H.A. Aisa, Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC-QTOF-MS, *Phytochem Anal.*, **28**(5), 465-473 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1002/pca.2695>
35. C.A. Topalović, M. Knežević, S. Gačnik, M. Mikulic-Petkovsek, Detailed chemical composition of juice from autochthonous pomegranate genotypes (*Punica granatum* L.) grown in different locations in Montenegro, *Food Chem.*, **330**, 127-137 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127261>
36. S. Wu, L. Tian, A new flavone glucoside together with known ellagitannins and flavones with anti-diabetic and anti-obesity activities from the flowers of pomegranate (*Punica granatum*), *Nat. Prod. Res.*, **33**(2), 252-257 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446009>
37. M.M. Özcan, M.S. Alkaltham, N. Uslu, A. Salamatullah, Effect of different roasting methods on the bioactive properties, phenolic compounds and fatty acid compositions of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Hicaz) seed and oils, *J. Food Sci. Technol.*, **58**, 2283-2294 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04739-1>
38. A.H. Ahmed, M. Ejo, T. Feyera, D. Regassa, B. Mammed, S.A. Huluka, *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of *Artemisia herba-alba* and *Punica granatum* against *Haemonchus contortus*, *J Parasitol Res.*, **27**, 4950196 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1155/2020/4950196>
39. F. Castagna, R. Bava, V. Musolino, C. Piras, A. Cardamone, C. Carresi, C. Lupia, A. Bosco, L. Rinaldi, G. Cringoli, E. Palma, V. Musella, D. Britti, Potential new therapeutic approaches based on *Punica granatum* fruits compared to synthetic anthelmintics for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in sheep, *Animals*, **12**(20), 2883 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/ani12202883>
40. A.M. Kaiaty, F.A. Salib, S.M. El-Gameel, A.M. Hussien, M.S. Kamel, Anthelmintic activity of pomegranate peel extract (*Punica granatum*) and synthetic anthelmintics against gastrointestinal nematodes in cattle, sheep, goats, and buffalos: *in vivo* study, *Parasitol Res.*, **120**, 3883-3893 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07311-8>
41. O.A. Olajide, A. Kumar, R. Velagapudi, U.P. Okorji, B.L. Fiebich, Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS-activated rat primary microglia, *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**(9), 1843-1851 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400163>

42. L. Tang, T. Li, B. Zhang, Z. Zhang, X. Sun, Y. Zhu, B. Feng, Z. Su, L. Yang, H. Li, H. Liu, Y. Chen, Z. Dai, X. Zheng, M. Li, C. Li, J. Zhao, X. Qiu, S. Ye, H. Liu, G. Zheng, B. Li, C. Lu, Punicalagin alleviates psoriasis by inhibiting NF- $\kappa$ B-Mediated IL-1 $\beta$  transcription and caspase-1-regulated IL-1 $\beta$  secretion, *Front Pharmacol.*, **13**, 817-526 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.817526>
43. A. Aygün, S. Özdemir, M. Gülcan, M.S. Yalçın, M. Uçar, F. Şen, Characterization and antioxidant-antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using *Punica granatum* extract, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **19**(4), 2781–2788 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03246-w>
44. M.F.A. Osman, S.S. Abdalla, S. Abdelghani, A.A. Mangi, L. Bashier Eltayeb, Anti-bacterial potential of (*Acacia nilotica*, *Trigonella foenum-graecum*, *Punica granatum* and *Commiphora myrrha*) crude extracts against diverse drug sensitive and resistant bacterial species, *Plant Sci. Today*, **9**(4), 970-976 (2022). Doi: <https://doi.org/10.14719/pst.1874>
45. A. Leesombun, L. Sariya, J. Taowan, C. Nakthong, O. Thongjuy, S. Boonmasawai, Natural antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of ethanolic extracts from *Punica granatum* L. tree barks mediated by extracellular signal-regulated kinase, *Plants*, **30**(17), 22-58 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/plants11172258>
46. A. Di Sotto, M. Locatelli, A. Macone, C. Toniolo, S. Cesa, S. Carradori, M. Eufemi, G. Mazzanti, S. Di Giacomo, Hypoglycemic, antiglycation, and cytoprotective properties of a phenol-rich extract from waste peel of *Punica granatum* L. var. Dente di Cavallo DC2, *Molecules*, **24**(17), 31-03 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24173103>
47. D. Jin, B. Zhang, Q. Li, J. Tu, B. Zhou, Effect of punicalagin on multiple targets in streptozotocin/high-fat diet-induced diabetic mice, *Food Funct.*, **11**(12), 10617-10634 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1039/D0FO01275K>
48. J.T. Jesse, K.S. Jagadish, V. Jency, Evaluation of the secondary metabolites of the waste pomegranate rind and its cytotoxicity against oral cancer (KB 3-1), *J. Pure Appl. Microbiol.*, **13**(1), 1667-1672 (2019). Doi: <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.40>
49. R. Selvam, D. Anandhi, D. Saravanan, K. Revathi, Antioxidant properties of *Punica grantum* fruit rind extract against liver hepatocellular carcinoma studied in HepG2 cell line, *Res. J. Pharm. Technol.*, **12**(10), 4719-4723 (2019). Doi: <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00813.8>

50. A.M. Hussein, N.M. El-Beih, M. Swellam, E.A. El-Hussieny, Pomegranate juice and punicalagin-mediated chemoprevention of hepatocellular carcinogenesis via regulating miR-21 and NF- $\kappa$ B-p65 in a rat model, *Cancer Cell Int.*, **22**(1), 333 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02759-9>
51. M.C. Cortez-Trejo, F.J. Olivas-Aguirre, E. Dufoo-Hurtado, R. Castañeda-Moreno, H. Villegas-Quintero, J. L. Medina-Franco, S. Mendoza, A. Wall-Medrano, Potential anticancer activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits of different color: *In vitro* and *in silico* evidence, *Biomolecules*, **12**(11), 16-49 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/biom12111649>
52. F. Fathi, S.N. Ebrahimi, D.M. Pereira, B.N. Estevinho, F. Rocha, Preliminary studies of microencapsulation and anticancer activity of polyphenols extract from *Punica granatum* peels, *Can. J. Chem. Eng.*, **100**(11), 3240-3252 (2022) Doi: <https://doi.org/10.1002/cjce.24348>
53. M. Yousof-Ali, S. Zaib, S. Jannat, I. Khan, Discovery of potent and selective dual cholinesterases and  $\beta$ -secretase inhibitors in pomegranate as a treatment for Alzheimer's disease, *Bioorg. Chem.*, **129**, 106-137 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106137>

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

A.R.d.S. Pereira-Rodrigues, C.D. Carvalho de Alencar, Perfil químico e atividades farmacológicas da *Punica granatum* (Punicaceae): uma revisão, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1074-1096 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.107461>

# Chemical characterization of Copaiba essential oil and study of its cellular cytotoxicity

Jacqueline Marques dos Santos<sup>1</sup>, Valéria Barbosa de Souza<sup>2</sup>, André Almeida Schenka<sup>2</sup>, Sílvia de Barros Mazon<sup>3</sup>, Rosana Maria Alberici Oliveira<sup>6</sup>, Carmen Lucia Queiroga<sup>4</sup>, Ildenize Barbosa da Silva Cunha<sup>5,6</sup>, Renan Marcel Bonilha Dezena<sup>7</sup>, Marcos Nogueira Eberlim<sup>6</sup>, Paulo César Pires Rosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>6</sup>Laboratory Thomson Mass Spectrometry, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>7</sup>Preformulation Specialist Consultant, Campinas-SP, Brazil.

\*Corresponding author: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5896-0093>. E-mail: paulocpr@unicamp.br

Received: April 3, 2023

Corrected: July 24, 2023

Accepted: July 31, 2023

## SUMMARY

**Introduction:** copaifera is a genus of plants that comprises several species that produce copaiba oil, which is widely used for various purposes, such as healing, anti-inflammatory, antimicrobial, wound antiseptic, anti-tumor, among other functions. There are very few chemical studies to characterize copaiba oil. **Aim:** To characterize 3 different species of copaiba oil. Subsequently, the effects of oils were estimated on neoplastic cells in a human glioma protocol (U251). **Methods:** 2 methods of analysis were used for the chemical characterization, GC-MS and ESI-MS. **Results:**



Through these analytical techniques, 20 types of components were found in the oils. Obtaining the cell viability and cytotoxicity of the oil we performed two methods, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and Neutral Red (NR), both assays were quantified by spectrophotometry. Concentrations of 1 to  $10^{-5}$   $\mu\text{g/mL}$  were used for 3 different species of copaiba oil and doxorubicin hydrochloride was used as a positive control. The 3 different species of copaiba oil from Pernambuco (oil 1) and Manaus (oils 2 and 3) were cytotoxic in U251, the  $\text{IC}_{50}$  value obtained was  $6.171 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $8.344 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  and  $1.385 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively. They also presented cytotoxic effect, with  $\text{IC}_{50}$ ,  $2.4 \cdot 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $3.7 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  and  $4.6 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively. A high correlation was evidenced between the MTT and Neutral Red studies for the three different species of copaiba oil, with  $\alpha=0.05$  and r values above 0.9, using the Pearson correlation coefficient. All types of resin oils positively affected cell proliferation of *in vitro* studies with a correspondence between concentration and effect.

**Keywords:** Copaiba oil, cytotoxicity and cell viability, human glioma.

## RESUMO

### Caracterização química do óleo essencial de copaíba e estudo de sua citotoxicidade celular

**Introdução:** copaífera é um gênero de plantas que compreende diversas espécies produtoras de óleo de copaíba, que é amplamente utilizado para diversas finalidades, como cicatrizante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antisséptico de feridas, antitumoral, entre outras funções. Existem poucos estudos químicos para caracterizar o óleo de copaíba. **Objetivo:** caracterizar 3 espécies diferentes de óleo de copaíba foram caracterizadas neste trabalho. Posteriormente, os efeitos dos óleos foram estimados em células neoplásicas em um protocolo de glioma humano (U251). **Métodos:** utilizamos 2 métodos de análise para a caracterização química, GC-MS e ESI-MS. **Resultados:** por meio dessas técnicas analíticas, 20 tipos de componentes foram encontrados nos óleos. Obtendo a viabilidade celular e a citotoxicidade do óleo realizamos dois métodos, o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e o Vermelho Neutro (NR), ambos os ensaios foram quantificados por espectrofotometria. Concentrações de 1 a  $10^{-5}$   $\mu\text{g/mL}$  foram usadas para 3 espécies diferentes de óleo de copaíba e cloridrato de doxorubicina foi usado como controle positivo. As 3 espécies diferentes de óleo de copaíba de Pernambuco

(óleo 1) e Manaus (óleos 2 e 3) foram citotóxicas em U251, o valor de  $IC_{50}$  obtido foi de  $6,171 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $8,344 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  e  $1,385 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Também apresentaram efeito citotóxico, com  $IC_{50}$ ,  $2,4 \cdot 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $3,7 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  e  $4,6 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Foi evidenciada uma alta correlação entre os estudos de MTT e Vermelho Neutro para as 3 diferentes espécies de óleo de copaíba, com valores de  $\alpha=0,05$  e  $r$  acima de 0,9, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Todos os tipos de óleos de resina afetaram positivamente a proliferação celular de estudos in vitro com uma correspondência entre concentração e efeito.

**Palavras-chave:** Óleo de copaíba, citotoxicidade e viabilidade celular, glioma humano.

## RESUMEN

### Caracterización química del aceite esencial de Copaiba y estudio de su citotoxicidad celular

**Introducción:** copaífera es un género de plantas que comprende varias especies que producen aceite de copaiba, el cual es ampliamente utilizado para diversos fines, como cicatrizante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antiséptico de heridas, antitumoral, entre otras funciones. Hay muy pocos estudios químicos para caracterizar el aceite de copaiba. **Objetivo:** caracterizar 3 especies diferentes de aceite de copaiba. Posteriormente, se estimaron los efectos de los aceites sobre las células neoplásicas en un protocolo de glioma humano (U251). **Métodos:** utilizamos 2 métodos de análisis para la caracterización química, GC-MS y ESI-MS. **Resultados:** a través de estas técnicas analíticas, se encontraron 20 tipos de componentes en los aceites. Para la obtención de la viabilidad celular y citotoxicidad del aceite se realizaron dos métodos, el MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) y el Rojo Neutro (NR), ambos ensayos fueron cuantificados por espectrofotometría. Se utilizaron concentraciones de  $1$  a  $10^{-5}$   $\mu\text{g/mL}$  para 3 especies diferentes de aceite de copaiba y se utilizó clorhidrato de doxorrubicina como control positivo. Las 3 especies diferentes de aceite de copaiba de Pernambuco (aceite 1) y Manaus (aceites 2 y 3) fueron citotóxicas en U251, el valor de  $IC_{50}$  obtenido fue de  $6,171 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $8,344 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  y  $1,385 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. También presentaron efecto citotóxico, con  $IC_{50}$ ,  $2,4 \cdot 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $3,7 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$  y  $4,6 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Se evidenció una alta correlación entre los estudios MTT y Neutral Red para las 3 diferentes especies de aceite de copaiba, con  $\alpha=0,05$  y valores de  $r$  superiores a

0,9, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los tipos de aceites de resina afectaron positivamente la proliferación celular de estudios in vitro con una correspondencia entre concentración y efecto.

Palabras clave: Aceite de copaiba, citotoxicidad y viabilidad celular, glioma humano.

## INTRODUCTION

The study of medicinal plants began a long time ago, going through generations until nowadays, due to its easy access, low cost and compatibility with popular traditions. The commercialization of medicines of plant origin has increased due to scientific advances in the chemical, pharmacological and toxicological areas [1]. Given this context, copaiba oils are widely used due to their many properties, such as medicinal, cosmetic and industrial [2].

The copaiba plants belong to the family Leguminosae, subfamily Caesalpinoideae, genus *Copaifera* [3, 4]. They are common to Latin America and West Africa, and usually live about 400 years, reaching heights between 25 and 40 meters [5, 6]. In Brazil, they are in the Southeast, Central-West and Northern regions, mainly covering the states of Amazonas, Pará and Ceará [7-9]. There are 72 described species of *Copaifera*, more than 20 of them are in Brazil, among which 17 are endemic. The main species are: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera cariaceae* and *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke [10, 11].

The oil from these trees — copaiba oil or balm — varies in yellow gold to brown coloring, depending on the species. The oil is extracted by making an incision in the trunk of the tree, it is composed of a solid, non-volatile resinous part formed by diterpene acids, corresponding to 55 to 60% of it, diluted in the other part, an essential oil, composed of sesquiterpenes [12-15]. This oil composition varies depending on the concentration and nature of the diterpenes and sesquiterpenes present, according to species variation, biological factors and abiotic factors [13-15]. Some of the active components in these oils are  $\beta$ -bisabolol and  $\beta$ -caryophyllene, both with anti-inflammatory action, in addition to bactericidal action in the second [16].

Indigenous populations of Brazil's Northern and Northeast regions have used the oil to treat various diseases since the 16th century [17]. Nowadays, it is popularly used as a wound healer, anti-inflammatory, antiseptic in wounds, antitumoral, eczemas, psoriasis and urticaria, anti-inflammatory of the urinary tract, in pulmonary affections (coughs,

pneumonia, bronchitis, antiasthmatic, colds and flu), sinusitis, scarring of small irritations of the scalp, dysentery, urinary incontinence, cystitis, leucorrhoea, analgesic and antitetanic [18-22].

Despite being used to treat various diseases, there are no studies on the effects of copaiba oil on gliomas. Gliomas are part of the group of neuroepithelial tumors that correspond to 31% of primary tumors (neuroepithelial, meninges, cranial and paraspinal nerves, germinative, sellar region and hematopoietic) and 80% of malignant tumors on the central nervous system (CNS) [23]. Among 1% of all neoplasms, it can be seen that this type of tumor in adults is responsible for about 2% of deaths attributed to malignant gliomas. In glioblastoma multiforme, the more aggressive type, the average survival time of patients is approximately one year after diagnosis, regardless of the strategy used in the treatment [24].

This study analyzed and characterized 3 types of oil from different species of copaiba tree from different regions of Brazil through gas chromatography with mass spectrometry detector (GC-MS) and easy ambient sonic-spray ionization with mass spectrometry detection mass spectrometry (ESI-MS). Evaluating cell viability and oil cytotoxicity in human glioma cells (U251).

## MATERIALS AND METHODS

We studied 3 different species of copaiba, one from the region of Pernambuco (1), and two others from the region of Manaus (2 and 3), all from Brazil. The Research Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP) approved this study through protocol number 2414-1.

### Chemical Analysis

We used two methods to perform the GC-MS and ESI-MS.

#### Esi-ms

For this study, the spectra were obtained in the negative mode, using a mass spectrometer with Orbitrap mass analyzer, Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap equipped with an ESI source (Thermo Scientific, San Jose, USA). The conditions of analysis were resolution (140,000); spray voltage (3.5 kV); 3 micro-scans per spectrum; capillary temperature (275 °C). The Xcalibur software was used to process the mass spectra (version 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation).

## CG-MS

GC-MS analyzes were performed using a gas chromatograph (HP6890) with a mass spectrometry detector (HP5975) equipped with a HP5-MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). The carrier gas was helium with flow rate of 1 mL per minute. The injector and detector temperatures were 220 and 290 °C, respectively. The injection volume was 1 μL and the samples were at a concentration of 15 mg/mL. The compounds were identified from their retention index in the NIST library database, using a homologous series of n-alkanes (C8-C22).

## Cytotoxicity and Cell Viability Assay

We performed two tests to determine the cytotoxicity and cell viability of the 3 samples of copaiba oils in the glioma cell line (U251), the MTT assay and Neutral Red. The experiments were performed six times and the results are presented as mean ± standard deviation. The positive control drug was doxorubicin hydrochloride.

## Cultivation of the Cell Line, U251

The U251 human cell line (glioma) was kindly given by the CPQBA - UNICAMP. We cultured the samples of this strain in cell culture flasks (75 cm<sup>3</sup>) containing RPMI 1640 (R6504, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (16000-044, Gibco), 2% Glutamax (35050-061, Gibco), 1% sodium pyruvate (S8636, Sigma) and 0.2% Pen Strep (15070-073, Gibco). The cells were incubated at an initial concentration of 3-10 × 10<sup>5</sup> cells/mL and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. When they reached 70-80% confluency, the cells were used for cytotoxicity and cell viability assays. The cell lines were stored in N<sub>2</sub>.

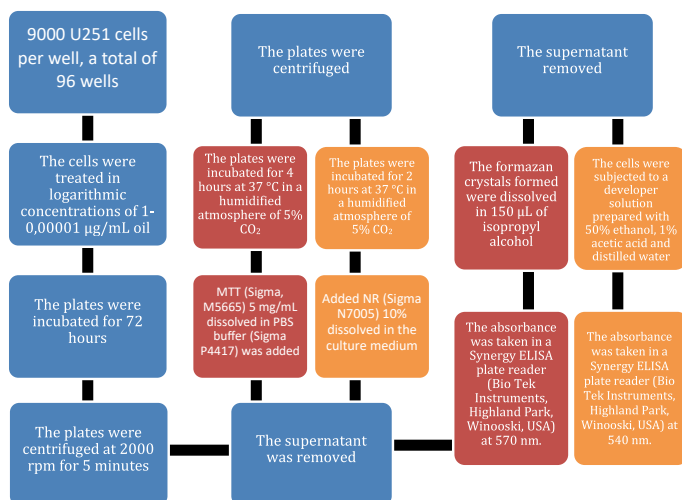
## MTT

Protocol [24]. The U251 cells (9 × 10<sup>5</sup> cells/well) were distributed in 96-well plates. The cell lines were treated with copaiba oil using 10<sup>-5</sup> μg/mL concentrations. The cells were incubated for 72 hours with copaiba oil, then the plates were centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The supernatant was removed, and MTT (Sigma, M5665) 5 mg/mL dissolved in PBS buffer (Sigma P4417) was added. The plates were incubated for 4 hours at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The plates were centrifuged again after this period, the supernatant was removed, and the formazan crystals were dissolved in 150 μL of isopropyl alcohol. The absorbance values were obtained using a Synergy ELISA plate reader (Bio Tek Instruments, Highland Park, Winooski, USA) at 570 nm. We expected 100% cell viability in the negative control.

## Neutral Red

Protocol [25]. The U251 cells were distributed in 96-well plates as described on the MTT protocol. The cells were incubated for 72 hours with copaiba oil, the plates were also centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The supernatant was removed, and the 10% NR (Sigma, N7005) dissolved in culture medium was added. The plates were incubated for 2 hours at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After this procedure, the plates were centrifuged again, the supernatant was removed, and the cells were subjected to a developing solution prepared with 50% ethanol, 1% acetic acid and distilled water. The absorbance values were obtained using a Synergy ELISA plate reader (Bio Tek Instruments, Highland Park, Winooski, USA) at 540 nm. We expected 100% cell viability in the negative control.

Figure 1 shows both assays described above for a better understanding:

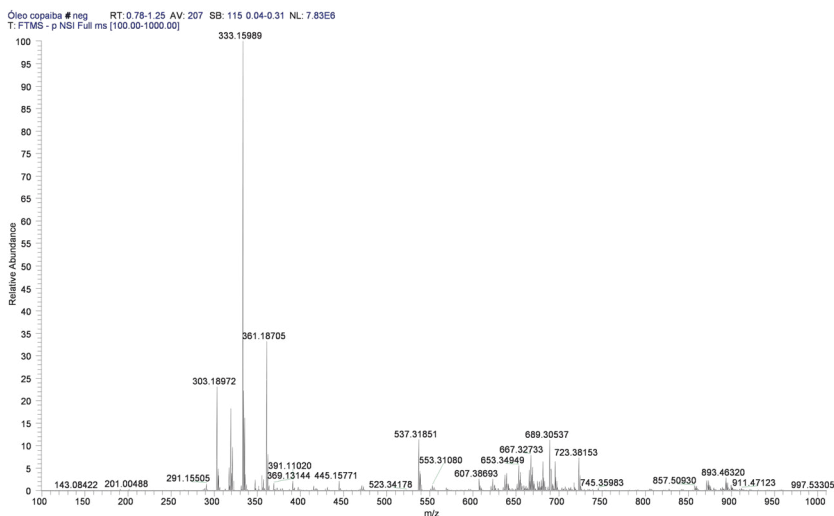


**Figure 1.** Scheme of tests: steps common for both are in blue, the steps of MTT are in red and the steps of Neutral Red are in orange [24, 25].

## RESULTS

### Chemical analysis

The ESI-MS spectra below present the chemical fingerprint of all 3 oils in the negative mode (Figure 2).



**Figure 2.** Spectrum of all 3 oils.

Our analysis of the spectra was based on a review study and tables 1 and 2 show the compounds identified in the oils through ESI-MS and GC-MS methods [21]:

**Table 1.** Compounds found in copaiba oils by the ESI-MS method.

Initials	Compounds	m/z	Oil 1	Oil 2	Oil 3
1	3-clerodane-15, 18-dioecious acid	335.17398	X		X
2	13-clerodane-15, 16-ylide-18-oic acid	333.15989		X	
3	clerodane-15, 16- dioecious acid	337.24000			X
4	<i>ent</i> -15, 16-epoxy-3, 13 (16), 14-clerodatriene-18-oic (Hardwickiic acid)	315.15045	X		
5	15, 16-epoxy-7 $\beta$ -acetoxy-3, 13 (16), 14-clerodatriene-18-oic acid	373.12381	X	X	
6	<i>ent</i> -15,16-epoxy-8 (17), 13 (16), 14-labdatriene-18-oic acid (Polyaltic acid)	315.15045	X		
7	18-hydroxy-8 (17), 13-labdadiene-15-oic acid (Copaiferolic acid)	319.18406		X	

(Continued)

Initials	Compounds	m/z	Oil 1	Oil 2	Oil 3
8	<i>ent</i> -11-hydroxy-labda-8 (17), 13-diene-15-oic acid (11-hydroxy-copalic acid)	319.18406		X	
9	<i>ent</i> -3-hydroxy-labda-8 (17), 13-diene-15-oic acid	319.18406		X	
10	<i>ent</i> -8 (17), 13-labdadiene-15, 19- dioecious acid ( <i>ent</i> -agatic acid)	333.15989		X	X
11	<i>ent</i> -8 (17)-labdeno-15,18-dioecious acid (eperu-8 (20)-15, 18- dioecious acid)	335.17398	X		X
12	<i>ent</i> -8 (17)-13E-labdadiene-15-oic acid (Copalic acid)	303.23109		X	X
13	<i>ent</i> -11-acetoxy-8 (17)-13E-labdadiene-15-oic (11-acetoxy-copalic acid)	361.18884		X	X
14	Kaur-16-en-18-oic acid	302.17212	X		

**Table 2.** Compounds found in copaiba oils by the GC-MS method.

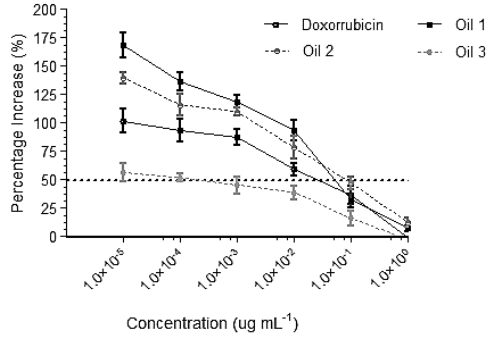
Initials	Compounds	MM	Oil 1	Oil 2	Oil 3
1	Kaur-16-ene	272	X		
2	Caticic acid	306	X		
3	Polyaltic acid	316	X		
4	3-acetoxy-copaiferic acid	362		X	X
5	Copalic acid	304		X	X
6	16-beta-Kauran-18-oic acid	304	X		
7	Kaur-16-en-18-oic acid	302	X		
8	Pinifolic acid	336	X		
9	Agathic acid	334		X	X

### Cytotoxicity and Cell Viability

The mean and standard deviation were calculated with the values found in the experiment, and from them we obtained the cell viability graphic and the IC<sub>50</sub> value, which represents the required concentration of each oil to cause the death of 50% of the treated cells, as shown in the Figures 3 and 4 and Table 3.

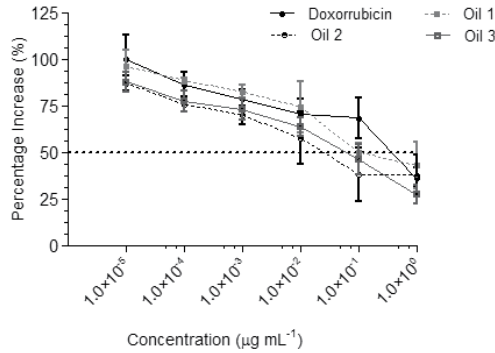


MTT



**Figure 3.** Graph of cell viability after 72 hours of treatment using *Copaifera* spp oil in a human glioma cell line (U251) for the MTT assay.

Neutral Red



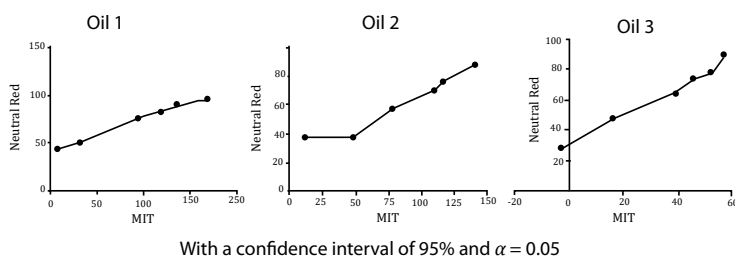
**Figure 4.** Graph of cell viability after 72 hours of treatment using *Copaifera* spp oil in a human glioma cell line (U251) for the NR test.

**Table 3.** IC<sub>50</sub> values of each copaiba oil sample after 72 hours.

Assay	IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	Oil 1	Oil2	Oil 3	Doxorubicin
MTT	0.06171	0.08344	0.0001385	0.02266
Neutral Red	0.2396	0.03769	0.04624	0.3426

### Correlation between MTT and Neutral Red Test

There was a significant correlation between the MTT and Neutral Red assays (Figure 5). We used the Pearson correlation coefficient to establish the correlation (Table 4).



**Figure 5.** Graphs of the MTT x Neutral Red assays for oils 1, 2, and 3.

**Table 4.** Pearson correlation coefficients for Oil 1, Oil 2, and Oil 3.

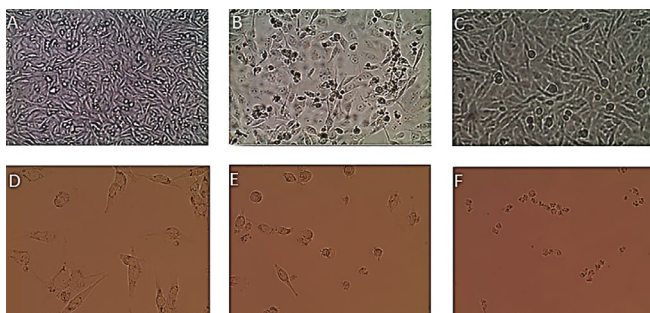
Coefficients	Oil 1 value	Oil 2 value	Oil 3 value
Pearson r	0.9972	0.9723	0.9934
Confidence Interval (95%)	0.9735 to 0.9997	0.7621 to 0.9971	0.9379 to 0.9993
<i>p</i> -value (two-tailed)	<i>p</i> <0.0001	0.0011	<i>p</i> <0.0001

The results show  $\alpha = 0.05$  and *r* values greater than 0.9, which indicates a strong correlation between both methods used. Despite being used to assess the viability/cytotoxicity of cells, each method we used needs different processes to measure this characteristic.

### Photomicrographs

The photomicrographs below show the effects of all oils on the U251 cells at a concentration of  $10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$  after 72 hours of treatment (Figure 6).

We can observe that the treated cells suffered intense nuclear pleomorphism, show little cohesiveness, nuclear pyknosis, and sometimes scant cytoplasm, dense chromatin, and nuclear atrophy. Cell death can also be observed in photomicrographs.



**Figure 6.** Effects of the copaiba oils. A) Control (untreated cells); B) Doxorubicin ( $10^{-1}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); C) Copaiba oil 1 ( $10^{-1}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); D) Copaiba Oil 2 ( $10^{-1}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); E) Copaiba oil 3 ( $10^{-1}\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); F) Copaiba Oil 3 ( $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). (Light microscopy, Olympus brand). 200x.

## DISCUSSION

We found a total of 23 compounds through the chromatography methods used, 14 through ESI-MS and 9 through GC-MS. 3 compounds are common to both techniques, Polylactic acid, Copalic acid, and kaur-16-en-18-oic acid. Gas chromatography identifies gases of lower molar mass, the sesquiterpenes, while ESI-MS identifies those of greater molar mass, the diterpenes. The number of compounds found in Oil 1 was 10, also 10 in Oil 2 and 8 in Oil 3.

The MTT assay consists of reducing yellow-colored tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide — Sigma M2128) through the succinic dehydrogenase of the enzyme present in the mitochondria of the tumor cell, which acquires a purplish color, is measured spectrophotometrically at 570 nm [25].

The Neutral Red test is based on the ability of viable cells to incorporate the dye in the lysosomes; thus, the red staining is evaluated by spectrophotometry at 540 nm.

Oil 3 presented the lowest  $\text{IC}_{50}$  value in the MTT assay, which was lower than the positive control, followed by Oil 1 and Oil 2, however, both presented greater values than doxorubicin.

For the Neutral Red test, all 3 oils presented  $\text{IC}_{50}$  values lower than the positive control, Oil 2 presented the best value.

## CONCLUSION

This study allowed us to observe some characteristics of copaiba oil and some of its compounds and its effects on tumor cells. Despite having different compositions, all 3 oils affected the cell line U251 positively. The results from the cell viability tests show slight differences regarding the IC<sub>50</sub> values of Neutral Red versus MTT assays for the 3 types of tested oils, which suggests that the oil interferes at the concentrations studied with cellular metabolic activity and integrity of the liposome membrane.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the financial support provided by CNPq.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest associated with this study.

## REFERENCES

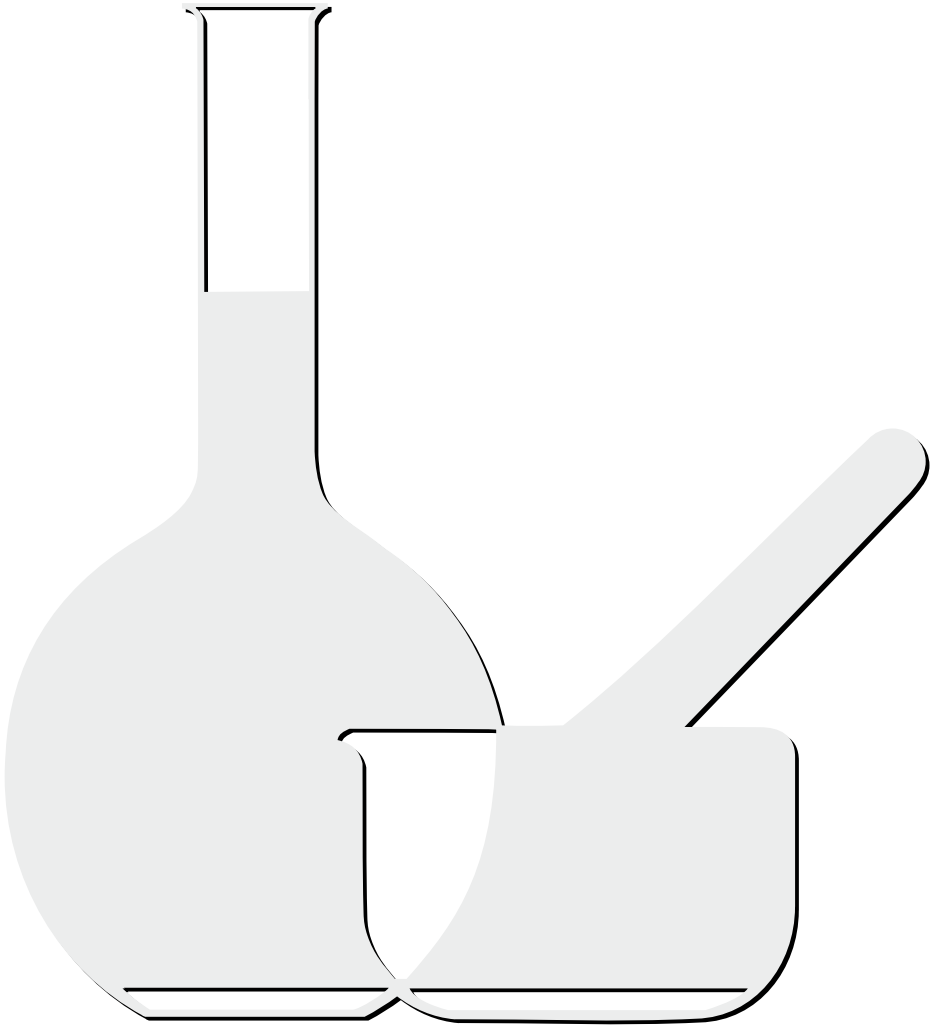
1. R.A. Yunes, C. Filho, *Química de Produtos Naturais: Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*, Univali, Itai, Brasil, 2007, p. 34-47.
2. M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, V.F. Veiga Junior, Medicinal plants: The need for multidisciplinary studies, *Quim. Nova*, **25**(3), 429-438 (2002).
3. V.F. Veiga Junior, A.C. Pinto, M.A.M. Maciel, Medicinal plants: Safe cure? *Quim. Nova*, **28**(3), 519-528 (2005).
4. E.C.P. Oliveira, O.A. Lameira, M.G.B. Zoghbi, Identification of the time of collection of copaiba oil-resin (*Copaifera* spp.) in the municipality of Moju, PA. *Rev. Bras. Plant. Med.*, **8**(3), 14-23 (2006).
5. S.G. Francisco, Use of Copaiba oil resin (*Copaifera officinalis* L) in gynecological inflammation, *Femina*, **33**(2), 89-93 (2005).
6. F.A. Araújo Júnior, M.N. Braz, O.G. Rocha-Neto, F.D'A. Costa, M.V.H. Brito, Copaiba oil effect on aminotransferases of rats with hepatic ischemia and reperfusion with and without ischemic preconditioning, *Acta Cir. Bras.*, **20**(1), 93-99 (2005).

7. F.A. Pieri, M.C. Mussi, M.A.S. Moreira, Copaiba oil (*Copaifera* sp.): History, extraction, industrial applications and medicinal properties, *Rev. Bras. Plant Med.*, **11**(4), 465-472 (2009).
8. L.A.F. Paiva, L.A. Gurgel, A.R. Campos, E.R. Silveira, V.S.N. Rao, Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by óleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats, *Life Sci.*, **75**(16), 1979-1987 (2004).
9. L.A. Paiva, L.A. Gurgel, E.T. De Sousa, E.R. Silveira, R.M. Silva, F.A. Santos, V.S.N. Rao, Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **93**(1), 51-56 (2004).
10. P.L. Tobouti, T.C.D.A. Martins, T.J. Pereira, M.C.M. Mussi, Antimicrobial activity of Copaiba oil: A review and a call for further research, *Biomed. Pharmacother.*, **94**, 93-99 (2017).
11. A.O. Santos, T.U. Nakamura, B.P. Dias Filho, V.F. Veiga Junior, A.C. Pinto, C.V. Nakamura, Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**(3), 277-281 (2008).
12. M.R.R. Tappin, J.F.G. Pereira, L.A. Lima, A.C. Siani, J.L. Mazzei, M.F.S. Ramos, Quantitative chemical analysis for the standardization of copaiba oil by high resolution gas chromatography, *Quim. Nova*, **27**(2), 236-240 (2004).
13. O.C. Rigamonte-Azevedo, P.G.S. Wadt, L.H.O. Wadt, *Copaiba: Ecologia e produção de óleo-resina*, Embrapa, Rio Branco, Brasil, 2004, 29 p.
14. V. Cascon, B. Gilbert, Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne, *Phytochem.*, **55**(7), 773-778 (2000).
15. M.F.S. Ramos, *Development of microcapsules containing the volatile fraction of copaiba by spray-drying: Study of stability and pharmacological evaluation*, Ph. D. thesis, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2006, 119 p.
16. R.F. Bonan, P.R.F. Bonan, A.U.D. Batista, F.C. Sampaio, A.J.R. Albuquerque, M.C.B. Moraes, L.H.C. Mattoso, G.M. Glenn, E.S. Medeiros, J.E. Oliveira, *In vitro* antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid) / polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil, *Mater. Sci. Engineering: C*, **48**, 372-377 (2015).

17. N.M. Gomes, C.M. Rezende, S.P. Fontes, M.E. Matheus, P.D. Fernandes, Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils, *J. Ethnopharmacol.*, **109**(3), 486-492 (2006).
18. W.F. Braga, C.M. Rezende, A.C. Pinto, O.A.C. Antunes, Terpenoids from *Copaifera cearensis*, *Phytochem.*, **49**(1), 263-264 (1998).
19. A.C. Pinto, W.F. Braga, V.F. Veiga Junior, M.L. Patitucci, F.M.S. Garrido, V.F. Veiga Junior, L. Bergter, M.L. Palitucci, O.A.C. Antunes, Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**(4), 355-360 (2000).
20. L.A.F. Paiva, V.S.N. Rao, N.V. Gramosa, E.R. Silveira, Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **62**(1), 73-78 (1998).
21. V.F. Veiga Junior, A.C. Pinto, O gênero *Copaifera* L., *Quim. Nova*, **25**(2), 273-286 (2002).
22. L.A.F. Paiva, K.M. De Alencar Cunha, F.A. Santos, N.V. Gramosa, E.R. Silveira, V.S.N. Rao, Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats, *Phytother. Res.*, **16**(8), 737-739 (2002).
23. L.F. Pavon, L.C. Marti, T.T. Sibov, L.A.M. Miyaki, S.M.F. Malheiros, J.V. Manami, R.A. Brandt, G.C. Ribas, J.R. Pagura, M.A.S. Joaquim, H.F. Junior, L.F. Gamarra, Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma, *Einstein*, **10**, 197-202 (2012).
24. M.L. Wong, A.H. Kaye, C.M. Hovens, Targeting malignant glioma survival signaling to improve clinical outcomes, *J. Clin. Neurosci.*, **14**(4), 301-308 (2007).
25. T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2), 55-63 (1983).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

J. Marques dos Santos, V. Barbosa de Souza, A. Almeida-Schenka, S. de Barros-Mazon, R.M. Alberici-Oliveira, C.L. Queiroga, I.B. da Silva-Cunha, R.M. Bonilha-Dezena, M. Nogueira-Eberlim, P.C. Pires-Rosa, Chemical characterization of Copaiba essential oil and study of its cellular cytotoxicity, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(2), 1097-1112 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.110756>





## 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 [rcci-quifa\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcci-quifa_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 Resumen. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palabras chave (debajo de Resumen). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index

Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

- En los manuscritos en español y portugués se empleará la coma (,) como separador decimal, en inglés se utilizará el punto (.).
- Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: Introducción, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones (si las hay), Agradecimientos, Conflicto de intereses y Referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.
- Las tablas deben llevar numeración 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  $\lambda$  max (solvente  $\epsilon$ ) nm (log  $\epsilon$ ). Ej.: UV  $\lambda$  max (MeOH) 275 (log  $\epsilon$  2,94).

IR  $\nu$  max (medio)  $\text{cm}^{-1}$ . Ej.: IR  $\nu$  max (KBr) 1740, 1720  $\text{cm}^{-1}$ .

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

RMN  $^1\text{H}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 3,84 (1H,  $d$ , J = 10,3 Hz, H-30).

RMN  $^{13}\text{C}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 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,  $\text{CHCl}_3$  = cloroformo,  $\text{C}_6\text{H}_6$  = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo,  $\text{Me}_2\text{CO}$  = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

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

### Referencias de los manuscritos

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, así:

**Revistas:** Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la revista debe ir en letra *itálica*, **volumen en negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

**Comunicaciones personales:** Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

**Libros:** Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

**Capítulos de libros escritos por varios autores:** Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de: En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

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

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

**Referencias de Internet:** Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista *rcciquifa\_fcbog@unal.edu.co*

**Comité Editorial**

Revista Colombiana de Ciencias  
Químico-Farmacéuticas  
Departamento de Farmacia  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.º 45-03  
Fax: 57-1-3165060

Bogotá - Colombia  
Correo electrónico:  
*rcciquifa\_fcbog@unal.edu.co*

Dirección WEB:  
*http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa*

*Revista Colombiana  
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 52(2)*  
se terminó de editar en Proeditor,  
en agosto de 2023.  
Bogotá, D. C., Colombia.

