

Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., vol. 54(1), enero-abril 2025

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: rccquifa_fcbog@unal.edu.co

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

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

<https://scholar.google.com/citations?user=TvBT68sAAAAJ&hl=es>

Rector Universidad Nacional de Colombia: Leopoldo Múnera Ruiz, Ph. D.

Vicerrectora sede Bogotá: Andrea Carolina Jiménez Martín, Ph. D.

Decana Facultad de Ciencias: Lucy Gabriela Delgado Murcia, Ph. D.

Director Departamento de Farmacia: Jaiver Eduardo Rosas Pérez, Ph. D.

Directora Área Curricular de Farmacia: Bibiana Margarita Rosa Vallejo Díaz, Ph. D.

Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas: Fleming Martínez Rodríguez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, correo electrónico: fmartinezr@unal.edu.co

Comité Científico:

Alejandro Sosnik, Ph. D., Department of Materials Science and Engineering, Israel Institute of Technology (Technion), Haifa, Israel.

Carlos Bregni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Carlos A. Calderón, Ph. D., Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, D. c., Colombia.

Fátima R. M. Barreto-Silva, Ph. D., Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil.

Juan M. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

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

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

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

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

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

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., Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.

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

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

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.

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

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

Evalúadores:

Ana M. González, Ph. D. (C), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Antonio Peña, Ph. D., Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

Carlos A. Calderón, Ph. D., Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, D. c., Colombia.

Claudia P. Ortiz, M. Sc., Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Iberoamericana, Neiva, Huila, Colombia.

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

Darío A. Tinjacá, Ph. D., Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque, Bogotá D. C., Colombia.

Diego I. Caviedes, Ph. D., Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Huila, 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, Sede Bogotá, D. C., Colombia.

Francy E. Torres, Ph. D., Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Magdalena, Colombia.

Jennifer K. Castro, Ph. D., Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

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

José J. López, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, D. C., Colombia.

Luis F. Ospina, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, D. C., Colombia.

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

Máximo A. Rodríguez, M. Sc., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, D. C., Colombia.

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

Reinaldo G. Sotomayor, M. Sc., Programa de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico, Colombia.

Rossember E. Cárdenas, M. Sc., Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad de América, Bogotá D. C., Colombia.

MISIÓN

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

VISIÓN

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

ÉTICA

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

LICENCIA CREATIVE COMMONS



Todo el contenido de esta revista, excepto donde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en http://co.creativecommons.org/?page_id=13

La totalidad de los números anteriores se encuentran disponibles en el sitio web:

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



Contenido

Development and validation of a new rapid reversed-phase HPLC method for the simultaneous quantification of melittin and apamin in apitoxin Valentina M. Rodríguez-Batista, Enrique Nogueira, Julio C. M. Brito & Catherine Fagundez.....	7
Medicación potencialmente inapropiada en adultos mayores de un hospital de tercer nivel Victoria Rincón-Domínguez, Laura De la Ossa-Useche, María Díaz-Merlano, Brenda Villamizar-Fragozo, Adriana Bustamante-Ahumada & Roxana De las Salas.....	18
Correlating Tacrolimus levels with dose formulation: Implications for toxicity and renal graft rejection in a cohort of kidney transplant recipients with steroid-free maintenance immunosuppression Natalia Gaitán-Torres, Nicolás Lozano-Suárez, Andrea García-López, Andrea Gómez-Montero & Fernando Girón-Luque.....	28
Barreras de acceso al cannabis medicinal en Colombia. Una revisión narrativa Guillermo A. Castaño, Sandra Carrillo & Rafael Malagón.....	44
Development and quality assessment of plantain flower [<i>Musa balbisiana</i> Colla] cookies: Beneficial for perimenopausal women Shanthini Priya Prakash & Silambu Selvi Kumbamoorthy.....	68
Investigation of the attitudes and experiences of pediatricians toward telehealth use during this pandemic (COVID-19) era Sunanda Jha, Upendra Prasad Sahu & Bhardwaj Narayan Chaudhary.....	89
Effect of caffeine consumption on the academic performance among students of University of Kalamoon (UOK) Farah Bitar.....	104
Microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio Ana Karina Albuja Landi, Paola Arguello-Hernández, Sandra Escobar Arrieta, Verónica Cando Brito, Judith Araque & Félix Andueza.....	113
Predicting drug solubility in cosolvent systems using artificial intelligence algorithms Neiba Yadira Echeagaray-Solorza, Yennifer Díaz-Romero, Lucila Guadalupe Tobón Galicia & Sebastián Tejada Paniagua.....	131
Incorrect determination of lower limit of quantification (LLOQ) of analytical methods Ali Shayanfar & Saba Rastgoo.....	145
Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) Sarg. Rosalia González-Fernández, Yamilé Heredia-Díaz, Julio César Escalona-Arraz, Yuselis Ramos-Domínguez, Paul Cos & Jesús García-Díaz.....	160
Como ser un cazador de impurezas en las sustancias activas: Una metodología y casos de estudio Juan Carlos Ortiz Lara.....	175

Therapeutic adherence and patient management in schizophrenia during outpatient pharmacotherapeutic follow-up: A case report Camila da Silva Lima, Joslene Lacerda Barreto, Max Denisson Mauricio Viana & Izabel Almeida Alves.....	207
Antiviral effect of anthocyanins in vegetables and fruits against viral diseases: Insight to medication design by computational chemistry approaches Fateme Mollaamin & Majid Monajjemi.....	218
Solid self-emulsifying dosage forms for carrying Amphotericin B: A preformulation study Francisco Alexandrino-Jr, Michelle A. Sarcinelli, Gabriel Barcellos, Leny A. H. Nascimento, Thalita M. Silva, Katty G. H. Silva, Livia D. Prado, Helvécio V. A. Rocha & Beatriz F. C. Patricio.....	231
Desarrollo y caracterización de un comprimido flotante a base de arcilla Montmorillonita y HPMC para liberación prolongada Perla García-Guzmán, Leticia Ortega Almanza, Liliana Schifter Aceves & Edgar Solís-Candelas.....	248
Análisis costo-beneficio de las vacunas para COVID-19 en Colombia Rafael Niño Castro, Brandon Stiven Arcos Gomez, Andrea Franco Sierra & Diego Restrepo.....	259
<i>In-vivo</i> pharmacokinetics evaluation of canagliflozin self-nanomicellizing solid dispersion as oral capsules dosage forms Nizar Awish Jassem.....	272
Diseño de una crema fitocosmética a partir del extracto de cáscara de <i>Nephelium lappaceum</i> L. aplicando un diseño de mezcla Gerson Jeriel Palacios Velepucha, Karelys Elibeth Vargas González, Viviana García Mir, Laura Leonor Valdez López & Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén.....	286
Prescripción de antimicrobianos en el hospital infantil sur “Antonio María Beguez Cesar”, Santiago de Cuba, Cuba, 2024 Luisa María Boizant Crombet, Leidys Guibert Basto, Rober Luis Mora Poll, Marielia Sell Lluveras & Yaima Palay Justiz.....	302

Development and validation of a new rapid reversed-phase HPLC method for the simultaneous quantification of melittin and apamin in apitoxin

Valentina M. Rodríguez-Batista ¹, Enrique Nogueira ¹, Julio C. M. Brito ² & Catherine Fagundez ^{1*}

¹ Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8 km 18, Montevideo, Uruguay

² Fundação Ezequiel Dias, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Gameleira, CEP 30510-010 Belo Horizonte - MG, Brazil

*Correspondent author: E-mail: cfagundez19@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7315-1438>

Received: June 20, 2024

Corrected: August 3, 2024

Accepted: August 8, 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119550>

SUMMARY

Context: High performance liquid chromatography (HPLC) is a high sensitivity and precision to apitoxin samples analysis. However, it has the disadvantage of incurring high financial, environmental and time costs. **Aims:** The aim of this study is to develop a shorter HPLC method for the quantification of apitoxin samples. **Methods:** The method was performed and validated on an RP-C18 column, mobile phases A (water and trifluoroacetic acid (TFA) 0.1%) and B (acetonitrile and TFA 0.1 %), gradient mode, flow rate 1.5 mL/min and 220 nm absorbance. **Key results:** The gradient elution 5% - 70% phase B over 20 minutes, after a 4-minute isocratic elution with 5% B at 25°C. Results showed a linear in the range between 0.084 and 0.84 mg/mL ($R^2=0.995$) for melittin and between 0.02 and 0.20 mg/mL ($R^2=0.995$) for apamin, accurate method (recovery rate 101.11 $\pm$ 9.47 % and 113.57 $\pm$ 15.06 % respectively). Precision: 10.37 and 9.33 for melittin and apamin respectively, and result of a selective method in its usual matrix. The LOD was 0.00178 and 0.00117 mg/mL, and LOQ was 0.00541 and 0.00353 mg/mL, for melittin and apamin, respectively.

Keywords: apamin; *Apis mellifera*; bee venom; HPLC analysis; melittin.

RESUMEN

Desarrollo y validación de un nuevo método rápido de HPLC en fase reversa para la cuantificación simultánea de melitina y apamina en apitoxina

Contexto: La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método de alta sensibilidad y precisión para el análisis de muestras de apitoxina. Sin embargo, tiene la desventaja de generar altos costos financieros, ambientales y de tiempo. **Objetivos:** El objetivo de este estudio es desarrollar un método de HPLC más corto para la cuantificación de muestras de apitoxina. **Métodos:** El método se realizó y validó en una columna RP-C18, fases móviles A (agua y ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) y B (acetonitrilo y TFA 0,1%), modo gradiente, velocidad de flujo 1,5 mL/min y absorbancia A 220 nm. **Resultados clave:** La elución en gradiente 5% - 70% de la fase B durante 20 minutos, después de una elución isocrática de 4 minutos con 5% de B a 25 °C. Los resultados mostraron una linealidad en el rango entre 0,084

y 0,84 mg/mL ($R^2=0,995$) para melitina y entre 0,02 y 0,20 mg/mL ($R^2=0,995$) para apamina, método preciso (tasa de recuperación $101,11 \pm 9,47\%$ y $113,57 \pm 15,06\%$ respectivamente). Precisión: 10,37 y 9,33 para melitina y apamina respectivamente, y resultado de un método selectivo en su matriz habitual. El LOD fue 0,00178 y 0,00117 mg/mL, mientras que el LOQ fue 0,00541 y 0,00353 mg/mL, para melitina y apamina, respectivamente.

Palabras clave: apamina; *Apis mellifera*; veneno de abeja; análisis HPLC; melitina.

RESUMO

Desenvolvimento e validação de um novo método rápido de HPLC de fase reversa para quantificação simultânea de melitina e apamina em apitoxina

Contexto: A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma análise de amostras de apitoxina de alta sensibilidade e precisão. No entanto, tem a desvantagem de incorrer em altos custos financeiros, ambientais e de tempo. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é desenvolver um método de HPLC mais curto para quantificação de amostras de apitoxina. **Métodos:** O método foi realizado e validado em uma coluna RP-C18, fases móveis A (água e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e B (acetonitrila e TFA 0,1%), modo gradiente, vazão de 1,5 mL/min e absorvância de 220 nm. **Principais resultados:** A eluição do gradiente de 5% - 70% da fase B ao longo de 20 minutos, após uma eluição isocrática de 4 minutos com 5% de B a 25 °C. Os resultados mostraram uma linearidade no intervalo entre 0,084 e 0,84 mg/mL ($R^2=0,995$) para melitina e entre 0,02 e 0,20 mg/mL ($R^2=0,995$) para apamina, método preciso (taxa de recuperação de $101,11 \pm 9,47\%$ e $113,57 \pm 15,06\%$ respectivamente). Precisão: 10,37 e 9,33 para melitina e apamina respectivamente, e resultado de um método seletivo em sua matriz usual. O LOD foi de 0,00178 e 0,00117 mg/mL, e o LOQ foi de 0,00541 e 0,00353 mg/mL, para melitina e apamina, respectivamente.

Palavras-chave: apamina; *Apis mellifera*; veneno de abelha; análise por HPLC; melitina.

1. INTRODUCTION

Apitoxin is the solid residue that results from the evaporation of bee venom (*Apis mellifera*) [1]. It is usually a complex mixture of nitrogenous compounds in which peptides predominate. It also contains enzymes, biogenic amines, carbohydrates and amino acids [2]. In medicine, it can be used for the treatment of various diseases [3-5]. It is presented in different ways, sometimes with separate components, or it has been shown that the synergy between some components can make a better contribution to the treatment of certain diseases [6-8]. These characteristics make it a product with high potential for use in the pharmaceutical industry [9].

Apitoxin has the particularity of being a natural base, so its quantitative composition can vary depending on different factors [10]. The genetics of the bee, the environment in which it develops (climate, availability and abundance of natural food), as well as the health and age of the bee are factors that have been shown to influence the production and properties of apitoxin [1, 11, 12]. It has been reported that environmental and biological factors can determine the quantitative differences in apitoxin, while human factors, such as the method and timing of venom extraction, including processing and storage conditions, should also be considered [11, 13, 14]. Therefore, due to the large number of factors that conditions the composition of apitoxin, its qualitative-quantitative analysis is necessary to control and ensure that this product meets the requirements requested for its commercialization and application in medicine.

High performance liquid chromatography (HPLC) was chosen for the analysis of apitoxin, because it offers advantages in terms of cost-benefit ratio and shorter analysis times compared to other methods such as size exclusion chromatography or capillary electrophoresis (Pacifikovfi *et al.*, 1995) [15]. Melittin, apamin and phospholipase A2 are the main components of

apitoxin and are therefore analyzed using HPLC methods. In addition, the cost of using standard methods would make these analyses prohibitively expensive. Reports on the analytical methods achieved with this technology include those by Rybak-Chmielewska and Szczêsna (2004) [16] and Ferreira Junior *et al.* (2010) [11]. However, a disadvantage of methods described is the long analysis time of around 35 to 50 minutes per sample, which means a high workload for carrying out these studies with a large number of samples. For this reason, the aim of this study was to develop and validate an HPLC analysis method with a shorter analysis time that still preserves the resolution between the peaks of the main components of apitoxin like melittin and apamin, as the main active ingredients sought in the venom. In addition, the applicability of the developed method in the qualitative-quantitative determination of different samples of apitoxin was investigated.

2. METHODOLOGY

The study consisted of two parts. Firstly, the development of a short analytical method using HPLC for the qualitative-quantitative analysis of apitoxin, while maintaining a good resolution of the peaks corresponding to the components of apitoxin. Once the optimized method was obtained, its validation was performed with standards for two of its main components: melittin and apamin. The HPLC system used was an HPLC-UV Dionex, Ultimate 3000, with standard LPG 3400 pump, WPS 3000 PL autosampler, detector (DAD) 3000, 50 μ L and 250 μ L loops, (from Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States) and a C18 reverse phase chromatographic column (Hibar® 5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm, Purospher STAR, from Merck, Darmstadt, Germany). The reagents and solvents used were Carlo Erba ppa., suitable for HPLC. The standards used were bee melittin with a purity of ≥ 85 % and a bee apamin standard with a purity of ≥ 95 %, acquired through Sigma-Aldrich. The apitoxin used was obtained commercially from Uruguayan producers, it was in its dry form and stored in amber bottles in a freezer at -4 °C, until the time of the analysis.

To prepare the samples, 21 mg of dry apitoxin solubilized in 25 mL of 0.1 % formic acid water solution were used. Once the sample was homogenized, it was filtered through a syringe filter with a 0.45 μ m membrane and 1 - 1.5 mL was loaded into vials.

2.1. Method optimization

They were then placed in HPLC for analysis using the chromatographic specifications described by Ferreira Junior *et al.* (2010) [11]. They were placed in a two-solvent system, where phase A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (H_2O) and phase B was 0.1% TFA in acetonitrile (MeCN). The sample was eluted at a flow rate of 1 mL/min with a gradient elution of 10 to 100 % phase B for 31 minutes, after a 5 minutes isocratic elution with 10 % B at a temperature of 25 °C. The diode array detector was set to a fixed wavelength of 220 and 280 nanometers (nm).

In order to optimize the starting method, 11 different methods were tested, whereby the flow rate and the composition of the mobile phase were varied by the elution gradient. The changes were made starting from the conditions of the starting method, which were monitored by the successive chromatograms, until the selected method was reached. The other conditions remained unchanged

2.2. Validation of the analytical method

Validation of the method was performed with melittin and apamin standards to determine linearity, limit of quantification, limit of detection, accuracy, precision and selectivity at two wavelengths ($\lambda = 220$ nm and 280 nm).

The linearity test consisted of chromatographic analysis of three copies of the same standard concentration used to calculate the calibration curve. The concentrations distributed over the entire range were 0.84, 0.168 and 0.084 mg/mL for melittin and 0.2, 0.04 and 0.02 mg/mL for apamin. Linearity was verified by statistical processing of the data using the correlation coefficient (R^2) of the calibration curve, analyzed at the two wavelengths studied.

Detection limit of an assay is the lowest concentration that can be detected but not necessarily quantified and the quantification limit is the lowest concentration that can be quantified with acceptable precision. The limits can be determined by three different methodologies according to the ICH guidelines: visual determination, signal-to-noise determination, and standard deviation and slope method [17, 18]. In this work, we were calculated using the results for linearity and the calibration curve. The following equations were applied:

- Detection limit: $= \frac{3.3 \times \sigma}{S}$
- Quantification limit: $= \frac{10 \times \sigma}{S}$

Where σ is the standard deviation of the peak areas for each lowest studied standard concentration level and S is the slope of the calibration curve.

To check the accuracy, solutions with a concentration of 60, 80, 100, 120 and 140 % of the theoretical concentration were prepared and analyzed three times each. They were then compared with the accepted reference values.

Precision was determined by repeatability and reproducibility. Repeatability is the precision under conditions where independent analytical results are obtained with the same method on identical test items in the same laboratory by the same operator using the same equipment within short time intervals. And reproducibility is the precision when the analysis results are obtained with the same method in identical analysis items under different conditions, whether in the laboratory, different operators, using different equipment, among others [17, 18]. For repeatability, the analysis of variance was performed for three replicates were prepared at a concentration of 0.1 mg/mL and each was analyzed six times. Intermediate precision was also measured to determine the test using the repeatability results and comparing them to the results of the same test performed the following day. For intra-laboratory reproducibility (i.e., precision within a laboratory), sample determination was performed in triplicate on 3 different days, and for interlaboratory reproducibility sample determination was performed ten times in the same day. The analysis of variance was performed for both trials. The coefficient of variation (CV%) was calculated as: $\%CV = (S/X) \times 100$, where X is the average of the concentrations.

The selectivity was determined under acidic, alkaline, oxidizing, reducing, thermal and photolytic degradation conditions using a reference solution of 0.1 mg/mL. A 1 M solution of hydrochloric acid (HCl) was added for acidic degradation and 1 M solution of sodium hydroxide (NaOH) was added for alkaline degradation. Both determinations were allowed to act for 1 hour and then analyzed by HPLC. For oxidation degradation, a 10 % hydrogen peroxide (H_2O_2) solution was added and left for 10 days, then the corresponding chromatogram was prepared. For the photolysis test, the sample was exposed to sunlight for 10 days and for the thermolysis test, the sample was left at a temperature of 100 °C for 10 days. The samples were then analyzed using HPLC.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained by the different modifications compared to the initial method are shown in Table 1. Given the increase in flow rate, the resulting chromatogram showed a decrease in the resolution of the peaks and a reduction in the elution time of the last component. The same happened when the elution gradient was increased. Subsequently, the gradient of the mobile phase was reduced, which led to a decrease in the elution time of the components and the resolution of the peaks. Based on these results, method 11 was selected for validation, with a final analysis time was 24 minutes. The required flow rate for the selected method was 1.5 mL/min, with an elution gradient of 5 to 70 % of phase B from analysis time 0 to 15, followed by an isocratic elution of 5 minutes with 70 % of phase B. Finally, the system stabilizes from 20.01 to 24 minutes with an isocratic flow of 5 % of phase B at a temperature of 25 °C. The retention time for melittin was 10.4 min, for apamin 5.0 min and for phospholipase A2 8.0 min.

Table 1. Variations made to optimize the starting method^a.

Method	Final time (min)	Changes ^b	Observations on the chromatograms
1	38	Increase flow rate	Increase time and inadequate peak resolution
2	38	Change gradient elution (5% - 100% phase B)	Increase time and inadequate peak resolution
3	35	Change gradient elution (5% - 80%/ 80% - 100% phase B)	Inadequate peak resolution
4	35	Change gradient elution (10% - 95% phase B)	Inadequate peak resolution
5	30	Change gradient elution (10% - 95% phase B)	2 peaks are observed, and the resolution is low (<2)
6	25	Change gradient elution (5% - 80% phase B)	4 peaks are observed, but the resolution is low (<2)
7	20	Change gradient elution (5% - 70% phase B)	4 peaks are observed, but the resolution is low (<2)
8	20	Change gradient elution (5% - 60% phase B)	4 peaks are observed, but the resolution is low (<2)
9	20	Change gradient elution (2.5% - 70% phase B)	4 peaks are observed, but the resolution is low (<2)
10	20	Change gradient elution (10% - 70% phase B)	4 peaks are observed, but the resolution is low (<2)
11	24	Change gradient elution (5% - 70% phase B)	7 peaks are observed, with an adequate

^a The conditions of the starting method were: flow rate 1.0 mL/min, two-solvent system where phase A was 0.1% TFA in H₂O and phase B was 0.1% TFA in MeCN, with a gradient elution of 10 to 100 % phase B for 31 minutes, and 5 minutes more with 10 % B, 25 °C, wavelength of 220 and 280 nm. ^b All tests were performed at a flow rate of 1.5 mL/min.

Thus, the results for the various validation parameters linearity, limits of detection and quantification, accuracy, selectivity, precision and selectivity, were as follows:

3.1. Linearity, detection limits and quantification limits

Table 2 shows the equations of the corresponding calibration curves for melittin and apamin, which were examined at a wavelength of 220 and 280 nm, respectively. In addition, the linearity result is included; in each case examined the value obtained by the R^2 exceeds 0.995. The values of the limits of quantification and detection are also included.

Table 2. Results for melittin and apamin at a wavelength of 220 and 280 nm, from the calibration curve equation, correlation coefficient, quantification limit and detection limit.

λ^a (nm)	Components	Calibration curve	R^2 ^b	Quantification limit (mg/mL)	Detection limit (mg/mL)
220	Melittin	$y = 412159x - 6891.2$	0.999	0.00541	0.00178
	Apamin	$y = 727866x - 2444.8$	1.000	0.00353	0.00117
280	Melittin	$y = 56307x - 2043.8$	0.999	0.00310	0.00101
	Apamin	$y = 10817x - 26.272$	0.999	0.00571	0.00189

^a λ (Wavelength). ^b R^2 (correlation coefficient).

3.2. Accuracy

Next, the precision is determined (Table 3). For apamin, none of the values obtained at wavelength of 280 nm were within the acceptable range, so they were not considered. For melittin, the results were acceptable at concentrations greater than 0.08. As for the results at 220 nm, with the exception of apamin at a concentration of 0.06 and 0.14, all values examined were acceptable.

Table 3. Results of the accuracy study for melittin at 220 and 280 nm and for apamin at 220 nm.

λ^a (nm)		220		280
Concentration (mg/mL)	Acceptance requirements	Melittin recovery (%)	Apamin recovery (%)	Melittin recovery (%)
0.06	60-115	113.90	141.29	129.49
		Accepted	Not accepted	Not accepted
0.08	60-115	88.09	105.47	100.89
		Accepted	Accepted	Accepted
0.100	80-110	99.78	105.67	112.36
		Accepted	Accepted	Not accepted
0.120	80-110	94.39	98.51	108.46
		Accepted	Accepted	Accepted
0.140	80-110	109.40	116.89	134.080
		Accepted	Not accepted	Not accepted

^a λ : Wavelength.

3.3. Precision

In the case of precision, measured by analysis of variance of repeatability (Table 4). Acceptance values were achieved in all tests except test 1 for apamin at 280 nm. In the case of mean precision (Table 5), all values fulfil the acceptance criterion.

Table 4. Repeatability data obtained for melittin and apamin, corresponding to the two wavelengths studied.

Component	λ^a (nm)	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 3		
		CV ^b	CVh ^c	CA ^d	CV ^b	CVh ^c	CA ^d	CV ^b	CVh ^c	CA ^d
Melittin	220	10.37	0.085	Accepted	1.03	0.10	Accepted	13.40	0.078	Accepted
	280	11.62	0.080	Accepted	1.67	0.098	Accepted	13.81	0.074	Accepted
Apamine	220	9.33	0.020	Accepted	1.16	0.020	Accepted	10.38	0.020	Accepted
	280	1.78	0.020	Not accepted	2.42	0.020	Accepted	13.50	0.020	Accepted

^a λ : Wavelength. ^b Coefficient of variation (CV) (%) calculated. ^c Horwitz coefficient of variation (CVh) % Horwitz. ^d Acceptance requirements: CV% > CVh %.

Table 5. Data obtained from the intermediate precision for melittin and apamin, corresponding to the two wavelengths studied.

Component	Melittin		Apamin	
λ^a (nm)	220	280	220	280
CVRi% calculado ^b	13.61	14.52	12.19	14.39
CVhRi % Horwitz ^c	0.086	0.080	0.020	0.020
Acceptance requirements, CV% > CVh %	Accepted	Accepted	Accepted	Accepted

^a λ : Wavelength. ^b CVRi (Internal Repeatability Coefficient of Variation) % calculated. ^c CVhRi % Horwitz (Horwitz coefficient of variation of internal repeatability).

The precision measured by analysis of variance of intra-laboratory and interlaboratory reproducibility showed in the table 6. Acceptance values were achieved in all tests except test 1 for apamin at 280 nm. Referring to the interlaboratory assay, only the quantification of melittin was carried out, apamin was not analyzed. Prior to this test, linearity was determined, resulting in non-linearity at the wavelength of 280 nm for that equipment. For this reason, reproducibility was not determined at that wavelength.

Table 6. Intra-laboratory and interlaboratory reproducibility data obtained for melittin and apamin, corresponding to the two wavelengths studied.

Component	λ^a (nm)	Intra-laboratory			Interlaboratory		
		CV ^b	CVh ^c	CA ^d	CV ^b	CVh ^c	CA ^d
Melittin	220	6.34	20.68	Accepted	2.26	17.61	Accepted
	280	8.52	21.51	Accepted	NA	NA	NA
Apamine	220	7.88	34.92	Accepted	NA	NA	NA
	280	NA	NA	NA	NA	NA	NA

^a λ : Wavelength. ^b Coefficient of variation (CV) (%) calculated. ^c Horwitz coefficient of variation (CVh) % Horwitz. ^d Acceptance requirements: CVRintra% < (2CVh%/3). ^d Acceptance requirements: CVRinterlab% < CVh%, NA.: not applicable.

3.4. Selectivity

The results of the selectivity study (Table 7) show that while all values are acceptable melittin at 220 nm, it does not achieve the expected results for acid degradation and the photolysis test at 280 nm. Since apamin was not quantifiable under the working conditions at 280 nm, the corresponding measurements were not performed. At 220 nm, although the method has shown that resolutions greater than 2 are not achieved, it would not be possible to quantify the product, therefore the method is not selective in this case, but it is possible to identify the compound in each of the tests to which it was subjected.

Table 7. Selectivity data obtained for melittin corresponding to the two working wavelengths and for apamin at 220 nm.

Component		Solution not subject to degradation	Acid degradation	Basic degradation	Oxidation degradation	Photolysis	Thermolysis
Melittin (220 nm)	RP ^a (%)	100.00	37.83	29.80	5.70	65.34	96.08
	Resolution ^b	-	13.14 ^c	11.95 ^c	19.23 ^c	3.64 ^c	13.02 ^c
Melittin (280 nm)	RP ^a (%)	100.00	10.12	11.64	12.03	13.30	9.69
	Resolution ^b		9.03 ^c	1.62 ^d	3.07 ^c	0.78 ^d	2.54 ^c
Apamin (220 nm)	RP ^a (%)	100.00	123.16	117.40	86.83	105.59	105.22
	Resolution ^b		0.68 ^d	1.12 ^d	0.96 ^d	1.20 ^d	0.40 ^d

^a RP: Recovery percentage. ^b Acceptance criteria: $R > 2$ for adjacent peaks (R: resolution). ^c Fulfills the acceptance criteria. ^d Doesn't fulfill the acceptance criteria.

Among the methods studied, there were some that had a shorter analysis time than the one chosen as a starting point, but with unacceptable resolutions between peaks ($R \geq 2$), this parameter being defined as a numerical measure that indicates the quality of a separation between two compounds [11, 18]. Low resolution results leads to insufficient analysis to identify and quantify the main constituents and thus do not fulfil the stated objectives.

When selecting the variables for method optimization, it was assumed that each one of them exhibited compromised results in the chromatographic test. These compromised results were considered for achieving a method that not only reduces analysis time but is also effective in quali-quantify assessing its main components.

The variables chosen for the method optimization included the flux and composition of the mobile phase determined by gradient variation. Among these, increasing the flux in a chromatographic analysis causes the main components of the injected mixture to elute more quickly, thereby shortening the run time. However, this may compromise the resolution of the peaks. Hence, adjustments to the variation of mobile phase gradients need to be complemented.

On the other hand, a higher concentration of the mobile phase organic modifier used (MeCN) resulted in a quicker elution of the mixture's components, leading to a decreased resolution between the peaks. Consequently, the elution gradient was adjusted by varying the proportion of acetonitrile, aiming to reduce retention times while attempting to approximate isocratic compositions of the mobile phase.

It was possible to establish a gradient that facilitates the elution of all components within the mixture in a 20-minute timeframe, with an additional 4 minutes required for final stabilization before commencing the next run.

To assess optimized method, linearity is determined within a range of useful concentrations, with the acceptance criterion set at $R^2 \geq 0.995$ for linear regression. All the obtained results surpassed this threshold, indicating that the method meets the linearity parameter within the study range.

While most accuracy and precision parameters for melittin complied within acceptance criteria at the two working wavelengths, certain parameters for apamin at 280 nm, such as accuracy and some precision tests, did not meet the established limits. This discrepancy is attributed to the lower absorptivity of apamin at 280 nm in the absorption spectrum, making it less visible to the detector and compromising its quantification. Despite this, due to the considerably higher concentration of melittin compared to apamin, quantification of melittin is still possible at that wavelength.

Attempts to increasing the concentration of apamin in apitoxin for analysis were hindered by the apitoxin maximum solubility. Consequently, it was determined that at 280 nm, a qualitative-quantitative analysis of the apitoxin is not feasible.

After validating the method for the two major components of the apitoxin, future researchers are encouraged to explore the possibility of validating the method for phospholipase A2, thereby enriching the analytical approach.

This work has some limitations that should be considered while interpreting the data. First, it was not possible to quantify apamin at the wavelength of 280 nm, so the use of the method is restricted to 220 nm. This is due to the low concentrations of apamin and that it has only 1 heterocycle in its structure that can be detected at 280 nm. Second, this method has been optimized for the quantification of melittin and apamin at 220, but the quantification of other main components of apitoxin will be included later. Third, it was not possible to determine the interlaboratory reproducibility for apamin since there were no standards to perform this assay, and it was also not possible to determine for melittin at 280 nm as wavelength since the response of the detector was not linear with the melittin concentrations used.

In conclusion, an HPLC analytical method was developed and validated to determine the qualitative-quantitative composition of the main components of apitoxin at 220 and 280 nm. The developed method presents a reduction in analysis times per sample of 12 minutes compared to the initial method, allowing a greater number of samples to be processed in less time. Regarding the validation carried out, it was found that the validated method is linear in the range between 0.084 and 0.84 mg/mL ($R^2=0.995$) for melittin and from 0.02 to 0.20 mg/mL ($R^2=0.995$) for apamin, accurate (recovery rate $101.11 \pm 9.47\%$ and $113.57 \pm 15.06\%$ respectively), and selective in its usual matrix for the quantification of melittin and apamin at 220 nm. This method was also precise, showing compliance with the acceptance criteria for intra and interlaboratory reproducibility and repeatability tests. The LOD was 0.00178 and 0.00117 mg/mL, and LOQ was 0.00541 and 0.00353 mg/mL for melittin and apamin, respectively. According to the results obtained, the appropriate wavelength for the qualitative-quantitative analysis of apitoxin is 220 nm.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Academic Unit of Pharmacology, Department of Veterinary Clinic and Hospital, of the Faculty of Veterinary Medicine, UdelaR, as well as the Nuclear Research Center of the Faculty of Sciences, UdelaR, for giving us the possibility of using the necessary materials, with particular emphasis on HPLC.

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

1. FAO. *Good beekeeping practices for sustainable beekeeping*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, 2021, 267 p. URL: <https://www.fao.org/3/cb5353en/cb5353en.pdf>
2. G.L. Demolin & S. Leite. Apitoxin. *Revista Unimontes Científica*, **7**(1), 115-125 (2005). URL: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/2422>
3. J. Silva, V. Monge-Fuentes, F. Gomes, K. Lopes, L.d. Anjos, G. Campos, *et al.* Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins* (Basel), **7**(8), 3179–3209 (2015). Doi: <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>
4. D.J. Son, J.W. Lee, Y.H. Lee, H.S. Song, C.K. Lee & J.T. Hong. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, **115**(2), 246–270 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>
5. R. Valderrama-Hernández. Biomedical and toxicological aspects of *Apis mellifera* bee venom. *Iatreia*, **16**(3), 217–227 (2003). Doi: <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.4004>
6. E.M. Dotimas & R.C. Hider. Honeybee venom. *Bee World*, **68**(2), 51–70 (1987). Doi: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1987.11098915>
7. H. Kim, S.-Y. Park & G. Lee. Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: A literature review. *Toxins* (Basel), **11**(7), 374 (2019). DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11070374>
8. S. Zhang, Y. Liu, Y. Ye, X.-R. Wang, L.-T. Lin, L.-Y. Xiao, *et al.* Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, **148**, 64–73 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.012>
9. Y.M. Lee, S.-N. Cho, E. Son, C.-H. Song & D.-S. Kim. Apamin from bee venom suppresses inflammation in a murine model of gouty arthritis. *J. Ethnopharmacol.*, **257**, 112860 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112860>
10. R.M. Soares-Terra. *Análise conformacional da melitina por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos do peptídeo na função plaquetária*. M.Sc. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil, 2006, 74 p. URL: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10943/000597541.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. R.S. Ferreira-Junior, J.M. Sciani, R. Marques-Porto, A. Lourenço-Junior, R.d.O. Orsi & B. Barraviera. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, **56**(3), 355–362 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.023>
12. E.E. Nowar. Venom glands parameters, venom production and composition of honeybee *Apis mellifera* L. affected by substitute feeding. *Middle East J. Agric. Res.*, **5**(4), 596–603 (2016). URL: <http://www.curreweb.com/mejar/mejar/2016/596-603.pdf>
13. S.I. Haggag, M.A. Abed-Al-Fattah, M.A. Ewies & M.A. El-feel. Effect of honeybee venom collection from different races on honey area. *Acad. J. Entomol.*, **8**(4), 190–192 (2015). URL: [https://idosi.org/aje/8\(4\)15/4.pdf](https://idosi.org/aje/8(4)15/4.pdf)
14. I. Flanjak, M. Kovačić, L. Primorac, A. Soldić, Z. Puškadija & B. Bilić-Rajs. Comparison between the quantity and quality of honey bee venom collected in the front and inside of the hive. *J. Apicult. Res.*, **63**(3), 584–589 (2021), Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2021.1994262>

15. V. Pacáková, K. Štulík, P.T. Hau, I. Jelínek, I. Vinš & D. Sýkora. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *J. Chromatogr. A*, **700**(1-2), 187–193 (1995). Doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01170-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01170-J)
16. H. Rybak-Chmielewska & T. Szczêsna. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J. Apicult. Sci.*, **48**(2), 103–109 (2004). URL: <https://mundi-alsiglo21.com/novedades/bee%20venom%206.pdf>
17. USP 47-NF 42. General Information. (1225) Validation of Compendial Procedures. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, 2024. Doi: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_01
18. B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, *et al.* Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Sección Metrología Ambiental y de Alimentos, Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública. Santiago, Chile, 2010, pp. 4-7. URL: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf

HOW TO CITE THIS ARTICLE

V.M. Rodríguez-Batista, E. Nogueira, J.C.M. Brito & C. Fagundez. Development and validation of a new rapid reversed-phase HPLC method for the simultaneous quantification of melittin and apamin in apitoxin. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 7–17 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119550>

Medicación potencialmente inapropiada en adultos mayores de un hospital de tercer nivel

Victoria Rincón-Domínguez, Laura De la Ossa-Useche, María Díaz-Merlano, Brenda Villamizar-Fragozo, Adriana Bustamante-Ahumada & Roxana De las Salas*

Departamento de Enfermería, División Ciencias de la Salud, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

*Autora de correspondencia: Correo electrónico: rdelassalas@uninorte.edu.co

Recibido: 5 de marzo de 2024

Corregido: 20 de agosto de 2024

Aceptado: 22 de agosto de 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.113336>

RESUMEN

Objetivo: Describir la medicación potencialmente inapropiada (MPI) en adultos mayores (≥ 60 años) de un hospital de tercer nivel ubicado en Atlántico, Colombia. **Métodos:** Estudio descriptivo transversal retrospectivo, de los ancianos hospitalizados en el período 2020 - 2021. El instrumento de recolección de datos incluye los elementos de las herramientas STOPP y Beers y criterios colombianos para la identificación de medicación potencialmente inapropiada. Se estimó un tamaño de población de 3.190 historias clínicas de pacientes hospitalizados del cual se obtuvo una muestra de 234 pacientes teniendo en cuenta la prevalencia de MPI de 20,7%, con una precisión de 5% y un intervalo de confianza del 95%. **Resultados:** La edad media fue de 73,89 ($\pm 10,00$). Según los criterios STOPP se encontró MPI en un 71,4% de la población ($n=167$). La MPI se relacionó mayormente con el uso de analgésicos y fármacos del sistema cardiovascular para los tres listados de criterios usados. **Conclusiones:** La MPI es un problema frecuente en adultos mayores, especialmente en aquellos con multimorbilidad y polimedicación.

Palabras Clave: Ancianos frágiles; polifarmacia; medicamentos potencialmente inapropiados; deprescripción.

SUMMARY

Potentially inappropriate medication in older adults in a tertiary hospital

Objective: To describe potentially inappropriate medication (PIM) in elderly people (≥ 60 years of age) at the Hospital Universidad del Norte, 2021. **Methods:** Retrospective cross-sectional descriptive study of the elderly hospitalized between 2020 and 2021. The data collection instrument includes the elements of the STOPP and Beers tools and Colombian criteria for identifying PIM. A population size of 3,190 inpatient medical records was estimated. A sample of 234 patient records was obtained considering a PIM prevalence of 20.7%, with a precision of 5% and a confidence interval of 95%. **Results:** The mean age was 73.89 years (± 10.00). According to the STOPP criteria, PIM was 71.4% ($n=167$). Analgesics and cardiovascular drugs were most related to PIM using the three criteria lists. **Conclusion:** PIM is a frequent problem in older adults, especially in those with chronic diseases and polymedication.

Keywords: Frail elderly; polypharmacy; potentially inappropriate medication list; deprescriptions.

RESUMO**Medicamentos potencialmente inapropiados em idosos em um hospital terciário**

Objetivo: Descrever medicamentos potencialmente inapropiados (MPI) em idosos (≥ 60 anos) em um hospital terciário localizado em Atlântico, Colômbia. **Métodos:** Estudo retrospectivo, descritivo e transversal com idosos hospitalizados no período de 2020-2021. O instrumento de coleta de dados inclui os elementos das ferramentas STOPP e Beers e os critérios colombianos para identificação de medicamentos potencialmente inapropiados. Foi estimado um tamanho populacional de 3.190 prontuários clínicos de pacientes hospitalizados, dos quais se obteve uma amostra de 234 pacientes, considerando a prevalência de IPM de 20,7%, com precisão de 5% e intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** A média de idade foi de 73,89 ($\pm 10,00$). De acordo com os critérios STOPP, o IPM foi encontrado em 71,4% da população ($n=167$). O IPM foi mais fortemente associado ao uso de analgésicos e medicamentos para o sistema cardiovascular para todas as três listas de critérios utilizadas. **Conclusões:** O IPM é um problema comum em idosos, especialmente naqueles com multimorbidade e polifarmácia.

Palavras-chave: Idoso frágil; polifarmácia; medicamentos potencialmente inapropiados; desprescrição.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia, se estima que el porcentaje de personas mayores de 60 años aumentará hasta el 17,5% para el año 2030 [1]. El envejecimiento del ser humano genera una serie de adaptaciones fisiológicas que generan cambios en los procesos químicos y biológicos propios de su organismo. Esta tendencia trae consigo un aumento en la aparición de enfermedades no transmisibles y alteraciones causadas por la edad, que a su vez generan polimedicación, y un mayor riesgo de aparición de la medicación potencialmente inapropiada (MPI) [2, 3].

La polifarmacia conlleva sobre todo en adultos mayores a la aparición de reacciones adversas que pueden amenazar la vida. Lo anterior, debido en gran parte a interacciones farmacológicas, características fisiológicas, presencia de comorbilidades, cambios del estado nutricional y modificaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas [4]. Por otra parte, la MPI se ha asociado con diversos eventos de relevancia clínica en adultos mayores como caídas, deterioro cognitivo y demencia. Es el caso de fármacos como las benzodiazepinas, antipsicóticos como olanzapina, opioides como la morfina sobre todo al inicio del tratamiento, diuréticos como la furosemida, nitratos de acción prolongada y antiarrítmicos [5].

A nivel mundial, la prevalencia de la MPI varía dependiendo del centro y el nivel de atención entre un 5% y 78% [6]. Por ello, han surgido distintas herramientas como los Criterios de Beers [7], Priscus [8], STOPP y START [9] diseñadas para optimizar la prescripción e identificar los medicamentos potencialmente inapropiados basadas en la evidencia y la investigación. Estas herramientas han sido utilizadas en múltiples escenarios ambulatorios, comunitarios y clínicos a nivel mundial donde su aplicación en estudios ha permitido obtener datos de interés. Por ejemplo, un estudio multicéntrico realizado en España en personas mayores identificó el uso inapropiado de grupos terapéuticos como las benzodiazepinas [10]. Asimismo, el estudio *Prevalence and Risk Factors Associated with Potentially Inappropriate Prescribing According to STOPP-2 Criteria among Discharged Older Patients* realizado por Sipos *et al.* con 417 pacientes del servicio de medicina interna de un hospital en Rumania donde gracias a la aplicación de los criterios STOPP, se encontró como principal prescripción inapropiada a los antitrombóticos en pacientes con alto riesgo de sangrado [11]. Finalmente, podemos citar como Azayzih *et al.* en su estudio *Potentially inappropriate medications prescribing according to Beers criteria among elderly outpatients in Jordan: a cross sectional study*, logró identificar que el 62,5% de la población

estudiada presentaba al menos una prescripción inapropiada gracias a la aplicación de los criterios de Beers [12]. Lo anterior muestra como estas herramientas han contribuido a identificar e intervenir oportunamente la medicación potencialmente inadecuada (MPI) y por tanto reducir el número de interacciones medicamentosas o de reacciones adversas generadas por la misma.

Adicionalmente, se han desarrollado estrategias guiadas a mejorar el abordaje de prescripciones inapropiadas como los criterios de prescripción propuestos recientemente para la región [13]. Esta propuesta se constituye como un apoyo a la prescripción de medicamentos por profesionales de atención en salud, lo que denota el compromiso por parte de todo el sector investigativo y académico para hacer frente a la problemática. Por todo lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo describir la medicación potencialmente inapropiada en personas mayores en un hospital de tercer nivel del departamento del Atlántico, en Colombia.

2. MÉTODOS

2.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con datos retrospectivos de personas mayores hospitalizadas en el servicio de medicina interna de un hospital de tercer nivel del departamento del Atlántico, Colombia durante el período entre julio de 2020 y junio de 2021.

2.2. Selección de participantes

Se incluyeron pacientes de 60 años o más que hubieran estado hospitalizados durante al menos 24 horas y que tuvieran una o más patologías. Se excluyeron pacientes cuyas historias clínicas estuvieran incompletas respecto a la farmacoterapia prescrita.

2.3. Recolección de datos

La información se recabó de las historias clínicas de los pacientes, para lo cual se utilizó una matriz de recolección diseñada por los investigadores que incluyó datos sociodemográficos (edad y sexo), información clínica (diagnóstico de hospitalización) e información de la farmacoterapia prescrita.

2.4. Análisis de los datos

Se estimó un tamaño de población de 3.190 pacientes hospitalizados y una muestra de 234 tomando la prevalencia de MPI de 20,7% [14] con una precisión de 5% y un intervalo de confianza del 95%. Los datos se recabaron de las historias clínicas a partir de la aplicación de los criterios de inclusión. Posteriormente, en una base de datos Excel® se realizó la depuración y codificación de la misma para luego realizar el cálculo de las medidas de distribución y frecuencia de las variables cualitativas y las medidas de tendencia central expresadas como promedio y su desviación estándar (DE) para las variables cuantitativas, en el software estadístico Epi Info. La estimación del riesgo se realizó mediante un análisis bivariado exploratorio de la variable dependiente (presencia o ausencia de MPI) y las diferentes variables independientes, mediante la estimación de la razón de probabilidad (odds ratio, OR), con su respectivo intervalo de confianza de 95% y la estimación del valor de p ($<0,05$). Los datos fueron analizados con Epi Info versión 7.2.

2.5. Consideraciones éticas

La presente investigación fue avalada por el Comité de Ética de la Universidad del Norte y por el Comité de Investigación del hospital. Además, este estudio fue clasificado como una

investigación sin riesgo según lo expuesto en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Se respetaron las consideraciones éticas de la Declaración de Helsinki.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización sociodemográfica y clínica de los participantes

Se encontró que el 55,5% (n=130) eran del sexo masculino y el 44,5% (n=104) femenino. La edad promedio fue de 73,89 ($\pm 10,00$). El número promedio de medicamentos prescritos fue de 5,77 ($\pm 7,6$), el promedio de días de estancia hospitalaria fue de 4,55 ($\pm 3,1$) y el promedio de patología fue de 1,87 ($\pm 1,5$), tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Características sociodemográficas de los pacientes

	Paciente					
	Masculino		Femenino			
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
60 – 70	49	37,69	44	42,33	93	39,80
71 – 80	50	38,46	38	36,55	88	37,60
81 – 90	29	22,30	20	19,25	49	20,9
91 – 94	2	1,54	2	1,94	4	1,70
TOTAL	130	100	104	100	234	100,00
Variable	Media				Desviación estándar	
Edad	73,89				±10,00	
# de medicamentos	5,77				±7,6	
Días de hospitalización	4,55				±3,1	
# de patologías	1,87				±1,5	

Fuente: Elaboración propia.

Según datos de la tabla 2, las enfermedades con mayor frecuencia fueron enfermedades del sistema circulatorio con un 30,3% (n=71), seguidas del sistema respiratorio con 19,65% (n=46) y por último las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas con 14,11% (n=33). El grupo terapéutico mayormente prescrito fueron aquellos usados en el sistema cardiovascular seguido de los preparados con insulina.

Tabla 2. Diagnósticos de hospitalización (CIE-10)

Diagnósticos de hospitalización (CIE-10)	Frecuencia	%
Enfermedades del sistema circulatorio	71	30,34
Enfermedades del sistema respiratorio	46	19,65
Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólica	33	14,11
Enfermedades del sistema genitourinario	14	5,99
Traumatismos y algunas otras consecuencias de causas externa	14	5,99
Enfermedades del sistema digestivo	11	4,71
Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo	10	4,20
Enfermedades del sistema nervioso	5	2,14
Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo	2	0,86
Otras	28	12
TOTAL	234	100

CIE: Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades.

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Medicación potencialmente inapropiada a partir de los criterios STOPP y factores relacionados

Así como se observa en la tabla 3, se encontró que el criterio mayormente relacionado con la MPI fue el uso de analgésicos con un 24,0% (n=40), seguido de fármacos del sistema cardiovascular con un 18,6% (n=31). La MPI estuvo presente en 167 participantes. La polimedicación global se presentó en un 89,7%.

En el análisis del número de criterios por paciente según STOPP se encontró que del total de pacientes (n=167), el 47,7% de los pacientes (n=100) presentó 1 criterio, el 16,2% (n=38) presentó 2 criterios. Además, la proporción de pacientes con Medicación Potencialmente Inapropiada (MPI) fue del 71,4% (n=167), mientras que el 28,6% (n=67) de los pacientes no presentaron MPI, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Medicación potencialmente inapropiada a partir de Criterios STOPP

Criterio	Total	%
Sección A. Identificación de medicamentos	23	13,5
Cualquier prescripción concomitante de dos fármacos de la misma clase	23	13,5
Sección B. Sistema cardiovascular	31	18,6
Antihipertensivos de acción central salvo intolerancia o falta de eficacia a otras clases de antihipertensivos	24	14,6
Antagonistas de la aldosterona junto con otros fármacos que pueden aumentar los niveles de potasio, sin monitoreo del potasio	2	1
Diuréticos de asa como tratamiento de primera línea para hipertensión arterial o cuando existe incontinencia urinaria	2	1
Sección C. Antiagregantes/Anticoagulantes	29	17,1
AAS a dosis superiores a 160 mg/día	5	3,1
AAS más clopidogrel para prevención secundaria del ictus salvo que el paciente tenga un stent coronario, un síndrome coronario agudo o una estenosis carotídea grave y sintomática	24	14
Sección D. Sistema nervioso central y psicológico	10	6
Benzodiacepinas durante más de cuatro semanas	11	7
Sección F. Sistema gastrointestinal	10	6,2
Medicamentos que suelen causar estreñimiento en pacientes con estreñimiento crónico cuando existen otras alternativas que no estriñen	10	6,2
Sistema H. Sistema musculoesquelético	23	13,6
Inhibidores selectivos de la COX-2 en pacientes con enfermedad cardiovascular	2	1
AINE en pacientes con hipertensión grave o insuficiencia cardíaca	22	13,6
Sección K: Fármacos que aumentan en forma predecible el riesgo de caídas en personas mayores	2	1
Benzodiacepinas	2	1
Sección L: Analgésicos	40	24
Uso de opioides pautados (no a demanda) sin asociar laxantes	20	12
Uso de opiáceos potentes, orales o transdérmicos como tratamiento de primera línea en el dolor leve	20	12
Total (repetición del evento)	167	100

Continúa

Tabla 3. Continuación.

Participantes con criterios MPI (conteo excluyente entre sí)		Total	%
Un sólo criterio		100	42,7
Dos criterios		38	16,2
Tres criterios		18	7,6
Cuatro criterios		7	2,9
Cinco criterios		3	1,2
Seis criterios		1	0,4
Pacientes sin MPI		67	28,6
Proporción de pacientes con MPI		Total	%
Participantes con MPI		167	71,4
Participantes sin MPI		67	28,6
Total (Repetición del evento)		234	100
Polimedicación global (>4 Medicamentos)	Pacientes con polimedicación	Pacientes no polimedicados	
89,7	210	24	

Fuente: Elaboración propia.

Tomando en cuenta los factores relacionados a la MPI según STOPP, se encontró que la frecuencia de MPI fue mayor en los pacientes con un rango de edad entre 60 a 80 años. La presencia de criterios de MPI fue mayor en el sexo masculino con el 38% (n=89). Por otra parte, la polimedicación (OR= 4,14 IC: 1,73 – 9,89) y la presencia de multimorbilidad (OR= 1,87 IC: 1,03 – 3,38) fueron los principales factores relacionados con la MPI, según lo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Factores relacionados a la MPI según criterios STOPP

Variable		N: 234	MPI (STOPP)				OR	IC
			SÍ		NO			
			F	%	F	%		
Edad	60 - 80	181	130	55,5	51	21,7	1,10	(0,56 – 2,15)
	81 - 94	53	37	15,8	16	6,8		
Sexo	Femenino	104	78	33,3	26	11,1	1,38	(0,77 – 2,46)
	Masculino	130	89	38,0	41	17,5		
Polimedicación	Sí	210	157	67,1	53	22,6	4,14	(1,73 – 9,89)
	No	24	10	4,37	14	5,99		
Multimorbilidad	Si	161	122	52,1	39	16,7	1,87	(1,03 – 3,38)
	No	73	45	19,2	28	12		

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza;

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Medicación potencialmente inapropiada a partir de la aplicación de criterios Beers

De acuerdo con los criterios Beers, el mayor número de prescripciones se presentó en el sistema cardiovascular con el 37% (n=18) y fármacos para el manejo del dolor con el 27,0% (n=15), así como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Medicación a partir de los criterios Beers

CATEGORÍA	TOTAL	%
Sistema cardiovascular	18	34
Bloqueadores Alfa - 1 (Doxazosina)	12	22
Espironolactona > 25 mg/día	5	9
Digoxina > 0.125 mg/día	1	1
Sistema nervioso central	5	9
Benzodiacepinas (Alprazolam, Lorazepam, Diazepam, Clonazepam)	5	9
Manejo del dolor	15	27
AINES no-COX Selectivos (AAS > 325 mg, Diclofenaco, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Meloxicam, Naproxeno)	10	17
Relajantes musculares (Ciclobenzaprina, Clorzoxazona, Cloromezanona)	5	9
Otros	16	30
Metoclopramida	16	30
Total	54	100

Fuente: Elaboración propia.

3.4. Medicación potencialmente inapropiada a partir de los criterios colombianos

Con base en estos criterios [13, 15], los fármacos con mayor MPI fueron los fármacos del sistema cardiovascular con el 37,3% (n=78), seguido de fármacos del sistema nervioso (analgésicos) con un 23,2% (n=28), como se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Medicación potencialmente inapropiada según criterios colombianos

CRITERIO	TOTAL	%
Fármacos usados en diabetes	36	17,3
Fármacos sistema cardiovascular	78	37,3
Sistema respiratorio	14	6,8
Fármacos para trastornos relacionados con el ácido	16	7,7
Fármacos del sistema nervioso	48	23,2
- Analgésicos	44	21
Misceláneos	16	7,7
Total	208	100

Fuente: Elaboración propia.

4. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la medicación de 234 personas mayores hospitalizadas utilizando tres listados de criterios; los STOPP, Beers y criterios colombianos. Se observa una concordancia en la frecuencia de MPI con los tres listados de criterios. Los analgésicos y fármacos del sistema cardiovascular fueron los mayormente reportados para STOPP, Beers y Criterios colombianos.

Los criterios STOPP permitieron identificar un criterio de MPI en el 71,4%, con una media de 6 medicamentos prescritos [14]. De forma similar, Baré *et al.* en su estudio de cohorte multicéntrico *Factors associated to potentially inappropriate prescribing in older patients according to*

STOPP/START criteria realizado con 740 pacientes hospitalizados polimedicados con una media de 10 prescripciones crónicas del servicio de medicina interna o de geriatría de 5 hospitales de España reportó que el 73,2% (n=542) de estos presentó al menos un criterio de MIP, resaltando que las drogas prescritas sin evidencia científica constituyeron el principal problema de MIP en el estudio, entre estas: los inhibidores de la bomba de protones y las benzodiacepinas presentadas en el 46,6% (n=345) de los pacientes [10]. Lo que sugiere que, a mayor número de medicamentos, mayor es el riesgo de tener MPI en esta población y que la prevalencia de esta es bastante alta.

De acuerdo con la aplicación de los criterios STOPP se encontró que los dos principales criterios relacionados con la MPI fueron la prescripción de analgésicos con un 24% (n=40) seguido de fármacos del sistema cardiovascular con un 18,6% (n=31). Similar a los criterios colombianos, se obtuvo que los fármacos que mayormente se relacionan con MPI fueron los fármacos del sistema cardiovascular con un 37,3% (n=78) y los del sistema nervioso (analgésicos) con un 23,2% (n=28). Por su parte, la lista AGS-Beers reportó MPI para los fármacos del sistema cardiovascular en un 37% (n=18) y analgésicos 27% (n=15). De forma similar, Sipos *et al.* (2023) en su estudio *Prevalence and Risk Factors Associated with Potentially Inappropriate Prescribing According to STOPP-2 Criteria among Discharged Older Patients* realizado con 417 pacientes del servicio de medicina interna de un hospital en Rumania, reportó que las fármacos más prescritas relacionadas con MPI fueron los agentes antitrombóticos (38,65%). Sin embargo, de forma similar se mencionan los agentes antihipertensivos que actúan en el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (11,14%) y los narcolépticos como ansiolíticos, hipnóticos y sedantes (10,04%) en segundo y tercer lugar [11]. Con estos resultados se puede evidenciar una fuerte asociación entre estos grupos farmacológicos y la presencia de MPI en esta población. Lo anterior se debe en gran parte a la presencia de enfermedades crónicas incluyendo las cardiovasculares en las personas mayores.

Respecto a la evaluación efectuada utilizando los criterios de Beers, se observó que el sistema con la mayor cantidad de prescripciones realizadas fue el sistema cardiovascular. Esto en contraste con Al-Azayzih *et al.* en su estudio *Potentially inappropriate medications prescribing according to Beers criteria among elderly outpatients in Jordan: a cross sectional study* en donde se reportó el manejo del dolor como el principal criterio con un 31,2%. En este estudio se destaca al género femenino y la polifarmacia como principales predictores de MPI en adultos mayores [12], lo que guarda similitud con lo encontrado en el presente estudio donde se destaca la (OR= 4,14 IC: 1,73 – 9,89) y la presencia de multimorbilidad (OR= 1,87 IC: 1,03 – 3,38) como los principales factores relacionados con la MPI.

Este estudio fortalece el crecimiento de las investigaciones referentes a la MPI en Colombia y América Latina, pudiendo ser tomado como referencia para la realización y el desarrollo de trabajos investigativos y de intervenciones que apunten a mejorar la farmacoterapia de la persona mayor.

5. CONCLUSIÓN

La medicación potencialmente inapropiada es un problema frecuente entre las personas mayores evaluadas con las tres herramientas utilizadas. La polimedicación y la multimorbilidad son los principales factores relacionados con la MPI. Los medicamentos antihipertensivos, las benzodiacepinas y los AINES se usan de manera inapropiada en esta población por lo que se requieren intervenciones conducentes a la optimización de su uso y a la educación sobre el mismo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Las autoras no declaran conflicto de intereses.

FINANCIACIÓN

La Universidad del Norte otorgó horas de la carga docente para la elaboración del artículo.

REFERENCIAS

1. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. Proyecciones de población. 2023. URL: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion>, consultado en septiembre 2023.
2. E. Esmeraldas-Velez, M. Falcones-Centeno, M. Vásquez-Zeballos & J. Solórzano-Velez. El envejecimiento del adulto mayor y sus principales características. *RECIMUNDO*, **3**, 45–71 (2019). Doi: [https://doi.org/10.26820/recimundo/3.\(1\).enero.2019.58-74](https://doi.org/10.26820/recimundo/3.(1).enero.2019.58-74)
3. H. Sánchez-Perez, F. Ramirez-Rosillo & R. Carrillo-Esper. Polifarmacia en el adulto mayor. Consideraciones en el perioperatorio. *Rev. Mex. Anesthesiol.*, **20**(1), 40–47 (2022). Doi: <https://doi.org/10.35366/102902>
4. J. Castro-Rodríguez, J. Orozco-Hernández & D. Marín-Medina. Polifarmacia y prescripción de medicamentos potencialmente no apropiados en ancianos. *Rev. Méd. Risaralda*, **22**(1), 52–57 (2016). URL: <http://scielo.org.co/pdf/rmri/v21n2/v21n2a11.pdf>
5. Centro Vasco de Información de Medicamentos CEVIME. Boletín INFAC. 2019. URL: <https://www.euskadi.eus/informacion/boletin-infac/web01-a2cevime/es/>, consultado diciembre 2023.
6. M.C. Ramírez-Bohórquez, A.L. Ruge-Perdomo, A.L. Saavedra-Vargas & M.A. Sogamoso-Bohórquez. *Efectos de la polifarmacia inadecuada sobre la calidad de vida de los adultos mayores en centros geriátricos de barrios unidos de la ciudad de Bogotá en el período de marzo a noviembre de 2017*. Trabajo de grado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA, Bogotá, 2017, pp. 1–98. URL: <https://repository.udca.edu.co/entities/publication/75dabed4-3d65-49a1-8c73-47fef18a223d>
7. American Geriatrics Society Beers Criteria® Update Expert Panel. American Geriatrics Society 2023 updated AGS Beers Criteria® for potentially inappropriate medication use in older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **71**(7), 2052–2081 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1111/jgs.18372>
8. N.K. Mann, T. Mathes, A. Sönnichsen, D. Pieper, E. Klager, M. Moussa & P.A. Thürmann. Potentially inadequate medications in the elderly: PRISCUS 2.0—First update of the PRISCUS list. *Dtsch. Arztebl. Int.*, **120**(1-2), 3–10 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2022.0377>
9. D. O'Mahony, A. Cherubini, A.R. Guiteras, M. Denking, J.-B. Beuscart, G. Onder, *et al.* STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 3. *Eur. Geriatr. Med.*, **14**, 625–632 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1007/s41999-023-00777-y>
10. M. Baré, M. Lleal, S. Ortonobes, M. Queralt, D. Sevilla-Sánchez, N. Carballo, E. De Jaime & S. Herranz. Factors associated to potentially inappropriate prescribing in older patients according to STOPP/START criteria: MoPIM multicentre cohort study. *BMC Geriatr.*, **22**, 44 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12877-021-02715-8>
11. M. Sipos, A. Farcas, D.C. Leucuta, N.B. Bulik, M. Huruba, D. Dumitrascu & C. Mogosan. Prevalence and risk factors associated with potentially inappropriate prescribing according to STOPP-2 criteria among discharged older patients—An observational retrospective study. *Pharmaceuticals*, **16**(6), 852 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph16060852>
12. A. Al-Azayzih, R. Alamoori & S. Altawalbeh. Potentially inappropriate medications prescribing according to Beers criteria among elderly outpatients in Jordan: a cross sectional study. *Pharm. Pract. (Granada)*, **17**(2), 1439 (2019). Doi: <https://dx.doi.org/10.18549/pharmpract.2019.2.1439>

13. R. De las salas, C. Vaca-González, J. Eslava-Schmalbach, C. Torres-Espinosa & A. Figueras. Tackling potentially inappropriate prescriptions in older adults: development of deprescribing criteria by consensus from experts in Colombia, Argentina, and Spain. *BMC Geriatr.*, **23**, 682 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12877-023-04271-9>
14. R. De las salas, V. Ahumada-Soto, R. Arévalo-Carrascal, K. De La Cruz-Charris, W. Hernández-Humanez, N. Muñoz-Gómez & M. Ruíz-Romero. Medicación potencialmente inapropiada en adultos mayores de un hospital del caribe colombiano. *Pharm. Care Esp.*, **22**(5), 338–352 (2020). URL: <https://www.pharmcareesp.com/index.php/PharmaCARE/article/view/577/485>
15. R. De las salas, J. Eslava-Schmalbach, C. Vaca-González, D. Rodríguez & A. Figueras. Development of a stepwise tool to aide primary health care professionals in the process of deprescribing in older persons. *Pharm. Pract. (Granada)*, **18**(4), 2033 (2020). Doi: <https://doi.org/10.18549/Pharm-Pract.2020.4.2033>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

V. Rincón-Domínguez, L. De la Ossa-Useche, M. Díaz-Merlano, B. Villamizar-Fragozo, A. Bustamante-Ahumada & R. De las Salas. Medicación potencialmente inapropiada en adultos mayores de un hospital de tercer nivel. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 18–27 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.113336>

Correlating Tacrolimus levels with dose formulation: Implications for toxicity and renal graft rejection in a cohort of kidney transplant recipients with steroid-free maintenance immunosuppression

Natalia Gaitán-Torres¹, Nicolás Lozano-Suárez², Andrea García-López^{2*}, Andrea Gómez-Montero² & Fernando Girón-Luque²

¹ Department of Transplant Pharmacology, Colombiana de Trasplantes, Av. Carrera 30 # 47A – 47, Bogotá D. C., Colombia

² Department of Transplant Research, Colombiana de Trasplantes, Av. Carrera 30 # 47A – 47, Bogotá D. C., Colombia

*Corresponding author E-mail: aegarcia@colombianadetrasplantes.com
(+57) (3005024618)

Authors' contribution: All persons who meet authorship criteria are listed as authors. All authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the manuscript's concept, design, analysis, writing, or revision.

Received: February 16, 2024

Corrected: August 15, 2024

Accepted: August 22, 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.113036>

SUMMARY

Correlating Tacrolimus Levels with Dose Formulation: Implications for Toxicity and Renal Graft Rejection in a cohort of kidney Transplant Recipients with Steroid-free maintenance immunosuppression

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) affects 10% of the worldwide population, being renal transplantation the optimal treatment for advanced stages. Post-transplant care involves immunosuppressive therapy, primarily utilizing tacrolimus, to prevent graft-rejection and failure. This study analyzes the correlation between tacrolimus blood levels, dosing, toxicity, and graft-rejection among renal transplant recipients with steroid-free maintenance immunosuppression in Colombia. **Methodology:** We conducted a retrospective cohort on kidney transplant patients followed at Colombiana de Trasplantes from 07-2019 to 06-2022, including patients with tacrolimus as immunosuppressive therapy that completed at least one year of post-transplant follow-up. Data on tacrolimus levels and transplant outcomes were collected at four intervals post-transplant. Bivariate analysis and unadjusted logistic regression were used to analyze the correlation and association between tacrolimus blood levels and tacrolimus doses, rejection, and toxicity. **Results:** The study included 368 patients. A weak correlation was found between variability of levels and dose ($\rho=0.31$, $p < 0.001$) but was not significant between tacrolimus doses and categorized blood levels. Acute graft-rejection occurred in 15.5% of patients, while only 3.8% experienced toxicity. No significant differences in rejection rates were observed with tacrolimus blood levels. **Conclusions:** This study found no significant

association between tacrolimus levels and graft-rejection, toxicity or categorized tacrolimus blood levels within the first-year post-transplant. However, the importance of tacrolimus level monitoring is underscored by its variability, influenced by dosing, adherence, and pharmacogenetics. Further research with a larger sample size is needed to improve our understanding of tacrolimus pharmacokinetics and encourage accurate reporting of toxicity in the Colombian population.

Keywords: Tacrolimus; graft rejection; toxicity; kidney transplantation; clinical pharmacology.

RESUMEN

Correlación de los niveles de tacrolimus con la formulación de la dosis: implicaciones para la toxicidad y el rechazo del injerto renal en una cohorte de receptores de trasplante renal con inmunosupresión de mantenimiento sin esteroides

Introducción: La enfermedad renal crónica (ERC) afecta al 10% de la población mundial, siendo el trasplante renal el tratamiento óptimo para estadios avanzados. El cuidado postrasplante implica terapia inmunosupresora, principalmente utilizando tacrolimus, para prevenir el rechazo y el fracaso del injerto. Este estudio analiza la correlación entre los niveles sanguíneos de tacrolimus, la dosis, la toxicidad y el rechazo del injerto entre los receptores de trasplante renal con inmunosupresión de mantenimiento sin esteroides en Colombia. **Metodología:** Realizamos una cohorte retrospectiva de pacientes trasplantados renales seguidos en Colombiana de Trasplantes desde 07-2019 hasta 06-2022, incluyendo pacientes con tacrolimus como terapia inmunosupresora que completaron al menos un año de seguimiento postrasplante. Los datos sobre los niveles de tacrolimus y los resultados del trasplante se recogieron en cuatro intervalos posteriores al trasplante. Se utilizó un análisis bivariado y una regresión logística no ajustada para analizar la correlación y la asociación entre los niveles sanguíneos de tacrolimus y las dosis de tacrolimus, el rechazo y la toxicidad. **Resultados:** El estudio incluyó a 368 pacientes. Se encontró una correlación débil entre la variabilidad de los niveles y la dosis ($\rho = 0,31$, $p < 0,001$), pero no fue significativa entre las dosis de tacrolimus y los niveles sanguíneos categorizados. El rechazo agudo del injerto se produjo en el 15,5% de los pacientes, mientras que solo el 3,8% experimentó toxicidad. No se observaron diferencias significativas en las tasas de rechazo con los niveles sanguíneos de tacrolimus. **Conclusiones:** Este estudio no encontró una asociación significativa entre los niveles de tacrolimus y el rechazo del injerto, la toxicidad o los niveles sanguíneos categorizados de tacrolimus durante el primer año posterior al trasplante. Sin embargo, la importancia de la monitorización de los niveles de tacrolimus se ve subrayada por su variabilidad, influenciada por la dosificación, la adherencia y la farmacogenética. Se necesitan más investigaciones con un tamaño de muestra mayor para mejorar nuestra comprensión de la farmacocinética del tacrolimus y fomentar la notificación precisa de la toxicidad en la población colombiana.

Palabras clave: Tacrolimus; rechazo del injerto; toxicidad; trasplante renal; farmacología clínica.

RESUMO

Correlação dos níveis de tacrolimus com a formulação da dose: implicações para a toxicidade e rejeição do enxerto renal em uma coorte de receptores de transplante renal com imunossupressão de manutenção sem esteroides

Introdução: A doença renal crônica (DRC) afeta 10% da população mundial, sendo o transplante renal o tratamento ideal para estágios avançados. O tratamento pós-transplante envolve terapia imunossupressora, utilizando principalmente tacrolimus, para prevenir a rejeição e a falha do enxerto. Este estudo analisa a

correlação entre os níveis sanguíneos de tacrolimus, dosagem, toxicidade e rejeição do enxerto entre receptores de transplante renal com imunossupressão de manutenção sem esteroides na Colômbia. **Metodologia:** Conduzimos uma coorte retrospectiva em pacientes transplantados renais acompanhados na Colombiana de Trasplantes de 07-2019 a 06-2022, incluindo pacientes com tacrolimus como terapia imunossupressora que completaram pelo menos um ano de acompanhamento pós-transplante. Dados sobre os níveis de tacrolimus e resultados do transplante foram coletados em quatro intervalos pós-transplante. Análise bivariada e regressão logística não ajustada foram usadas para analisar a correlação e associação entre os níveis sanguíneos de tacrolimus e doses de tacrolimus, rejeição e toxicidade. **Resultados:** O estudo incluiu 368 pacientes. Uma correlação fraca foi encontrada entre a variabilidade dos níveis e dose ($\rho=0,31$, $p < 0,001$), mas não foi significativa entre as doses de tacrolimus e os níveis sanguíneos categorizados. A rejeição aguda do enxerto ocorreu em 15,5% dos pacientes, enquanto apenas 3,8% apresentaram toxicidade. Nenhuma diferença significativa nas taxas de rejeição foi observada com os níveis sanguíneos de tacrolimus. **Conclusões:** Este estudo não encontrou associação significativa entre os níveis de tacrolimus e a rejeição do enxerto, toxicidade ou níveis sanguíneos categorizados de tacrolimus no primeiro ano pós-transplante. No entanto, a importância do monitoramento dos níveis de tacrolimus é ressaltada por sua variabilidade, influenciada pela dosagem, adesão e farmacogenética. Mais pesquisas com um tamanho de amostra maior são necessárias para melhorar nossa compreensão da farmacocinética do tacrolimus e encorajar relatórios precisos de toxicidade na população colombiana.

Palavras-chave: Tacrolimus; rejeição de enxerto; toxicidade; transplante renal; farmacologia clínica.

1. INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) affects 10% of the world's population [1, 2], and it is divided into five stages depending on the progression of the disease. In the severe loss of renal function or late-stage CKD, renal transplantation is considered the best treatment option, improving the quality of life and patient survival [3]. Once a patient has been transplanted, immunosuppressive therapy is a fundamental part of organ maintenance, which prevents renal graft rejection.

Within immunosuppressive therapy, tacrolimus is one of the most widely used immunosuppressants. It is usually used in combination therapy with steroids and a purine synthesis inhibitor, such as mycophenolate [4]. In Colombia for the year 2020, the high-cost account (in Spanish Cuenta de Alto Costo – CAC) reported that immunosuppressive therapy with a three-drug regimen was used in 59% of cases and a two-drug regimen in 35.5% of renal transplants. Moreover, tacrolimus was part of the three and two-drug regimen in 93.6% and 83.8% of cases, respectively [3]. This demonstrates the relevance of tacrolimus and its wide use in immunosuppressive therapy.

Tacrolimus is a prodrug belonging to the group of calcineurin inhibitors. Its mechanism of action is that once it binds to the FKBP family protein. This binding inhibits the early-stage activation of T cells, preventing the activation of T lymphocytes and their IL-2-dependent proliferation. Consequently, this interruption hinders the entire activation cascade of cells, including B cells [5]. The plasma concentration of tacrolimus varies due to different intra- and interindividual factors [5]. Recognized for its narrow therapeutic [6] maintaining tacrolimus levels within a specific range is crucial for effective post-renal transplant patient following [7]. Achieving this balance is a significant challenge in clinical practice, requiring precise dosing tailored to each patient

[7]. This precision is vital to mitigate the risk of renal rejection and toxicity, a concern heightened during the initial post-transplantation year when renal graft rejection is most prevalent [8].

This study aims to explore the correlation between tacrolimus levels and formulated dose, and association with toxicity, and renal graft rejection in renal transplant patients. As there is variability in tacrolimus levels and limited local evidence on the relevance of these levels to renal transplant outcomes, the results of this study could help clinicians make informed decisions, individualize patient treatments, and increase the knowledge of pharmacists on the drug's pharmacovigilance and optimization of its use. Overall, this study has the potential to improve the outcomes of renal transplant patients and advance our understanding of the optimal use of tacrolimus.

2. METHODOLOGY

2.1. Type of Study

An observational, analytical, retrospective cohort study that included patients who underwent kidney transplantation in Colombiana de Trasplantes between July 2019 and June 2022. All patients received initially a steroid-free maintenance immunosuppression therapy with double therapy that included tacrolimus, some patients required steroid addition in the following by individualized reasons. All the included patients completed at least one year of post-transplant follow-up. There were no exclusions. A convenience sampling was performed, including all patients who met the selection criteria in the period under evaluation.

2.2. Data collection and study variables

Data were systematically extracted from electronic medical records, encompassing comprehensive information such as laboratory results, sociodemographic details, formulation specifics, and biopsy records. The study conducted four distinct review points over the course of the year, during which tacrolimus levels, formulation adjustments, and instances of acute rejection were meticulously examined. These assessment intervals occurred at the first month, third month, sixth month, and twelfth month post-transplantation. At the end of the following period, an overall incidence of toxicity and acute rejection were obtained.

Acute rejection was defined as a pathological diagnosis based on the Banff Classification of a renal graft biopsy. Tacrolimus blood levels were also categorized as decreased (<5 ng/ml), optimal (5-8 ng/ml) and elevated (>8 ng/ml). Finally, to determine the incidence of toxicity, the terms "toxicity, tacrolimus toxicity, tacrolimus nephrotoxicity, tacrolimus nephrotoxicity, tacrolimus nephropathy, tremor, acne, hair loss, gastrointestinal symptoms, tacrolimus nephrotoxicity, tacrolimus nephropathy, tremor, acne, hair loss, gastrointestinal symptoms" were used, tacrolimus nephrotoxicity, tacrolimus dose adjustment, over-immunosuppression, elevated tacrolimus levels, neurotoxicity, headache and elevated creatinine" as key terms in first-year post-transplant consultations.

2.3. Statistical analysis

A descriptive analysis of clinical variables, doses, and tacrolimus levels was performed. Qualitative data were described in relative and absolute frequencies, and quantitative data in measures

of central tendency and dispersion according to their distribution. Normal distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnoff and Shapiro-Wilk tests. Categorical variables were compared by chi- and Mann Whitney U test for numerical variables. The incidence of rejection and toxicity at one-year post-transplantation of the included patients was described.

The correlation between tacrolimus levels and doses was evaluated by means of Spearman's correlation index considering a value of 0 - 0.25 as little or no correlation, 0.26-0.50 weak, 0.51-0.75 between moderate to strong and 0.76- 1.00 between strong to perfect. The categorizations of tacrolimus blood levels and dose were compared by mosaic plot, Cramer's v and chi-square. Finally, unadjusted Odds Ratios and confidence intervals (95%) were calculated for rejection by a logistic regression. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed in R Studio 3.3.0.

2.4. Ethical aspects

All transplants performed were in accordance with the Istanbul Declaration for organ donation, as well as national and international research guidelines. According to resolution 8430 of 1993, the study is a risk-free study, which is why it was exempted by the ethics committee from informed consent (Approval No. 01865).

3. RESULTS

We analyzed 368 kidney transplant patients, most had cadaveric donor transplantation (64.4%), with a median age of 44 years (RIC 33-56), weight of 68 kg (RIC 57-77) and a male population of 57.6%. The overall average tacrolimus levels during the initial two weeks post-transplantation were 4.98 ng/ml and showing an upward trend over subsequent months: 5.93 ng/ml in the first month, 6.18 ng/ml in the third month, 7.55 ng/ml in the sixth month, and 6.77 ng/ml at the twelfth month. On average, patients underwent 1.83 tacrolimus level assessments during their first-year post-transplant. Among the patients evaluated, 15.5% presented acute graft rejection and only 3.8% toxicity. There were not significant differences in rejection when comparing the added immunosuppression maintenance with mycophenolate and prednisolone. The detailed analysis is presented in Tables 1 and 2.

Table 1. Descriptive analysis of clinical and pharmacological characteristics and incidence of the main outcomes.

	Total (N=368)
Age (years), Median [IQR]	44.0 [33.0, 56.0]
Sex, n(%)	
Femenine	156 (42.4%)
Masculine	212 (57.6%)
Donor type, n(%)	
Deceased	237 (64.4%)
Living non-related	31 (8.4%)
Living related	100 (27.2%)
Weight (kg/m2), Median [IQR]	68.0 [57.0, 77.0]
Missing data	3 (0.8%)
Tacrolimus level first 2 weeks (ng/ml), Median [IQR]	4.20 [2.70, 6.23]
Missing data	144 (39.1%)
Maximum tacrolimus level (ng/ml), Median [IQR]	5.90 [4.50, 8.80]
Missing data	33 (9.0%)
Minimum tacrolimus level (ng/ml), Median [IQR]	3.80 [2.70, 5.85]
Missing data	33 (9.0%)
Number of tacrolimus levels, Median [IQR]	2.00 [1.00, 2.00]
Tacrolimus daily dose adjusted by weight, Median [IQR]	6.80 [5.70, 7.70]
Maximum tacrolimus daily dose (mg), Median [IQR]	5.00 [4.00, 6.00]
Missing data	11 (3.0%)
Minimum tacrolimus daily dose (mg), Median [IQR]	3.00 [2.00, 4.00]
Missing data	11 (3.0%)
Toxicity, n(%)	14 (3.8%)
Acute rejection, n(%)	57 (15.5%)
Banff pathological clasification, n(%)	
1A	33 (9.0%)
1B	11 (3.0%)
2A	1 (0.3%)
Borderline	10 (2.7%)
Non-classified	2 (0.5%)
Non-biopsy	311 (84.5%)

Table 2. Bivariate analysis of rejection at the first, third, sixth and twelfth month and different clinical and pharmacological variables.

	1 MONTH GRAFT REJECTION			3 MONTH GRAFT REJECTION			6 MONTH GRAFT REJECTION			12 MONTH GRAFT REJECTION			TOTAL
	No	Yes	P value	No	Yes	P value	No	Yes	P value	No	Yes	P value	(N=368)
	(n=335)	(n=33)		(n=361)	(n=7)		(n=361)	(n=7)		(n=362)	(n=6)		
Age (years), Median [IQR]	44.0 [33.5, 56.0]	39.0 [30.0, 51.0]		44.0 [33.0, 56.0]	47.0 [37.5, 56.5]	0.951	44.0 [33.0, 56.0]	42.0 [37.5, 50.0]	0.962	44.0 [33.3, 56.0]	34.5 [29.3, 39.8]	0.199	44.0 [33.0, 56.0]
Sex, n(%)													
Femenine	143 (42.7%)	13 (39.4%)	0.935	153 (42.4%)	3 (42.9%)	1	154 (42.7%)	2 (28.6%)	0.757	152 (42.0%)	4 (66.7%)	0.479	156 (42.4%)
Masculine	192 (57.3%)	20 (60.6%)		208 (57.6%)	4 (57.1%)		207 (57.3%)	5 (71.4%)		210 (58.0%)	2 (33.3%)		212 (57.6%)
Donor type, n(%)													
Deceased	217 (64.8%)	20 (60.6%)	0.935	232 (64.3%)	5 (71.4%)	0.941	231 (64.0%)	6 (85.7%)	0.819	233 (64.4%)	4 (66.7%)	0.946	237 (64.4%)
Living non-related	29 (8.7%)	2 (6.1%)		30 (8.3%)	1 (14.3%)		31 (8.6%)	0 (0%)		30 (8.3%)	1 (16.7%)		31 (8.4%)
Living related	89 (26.6%)	11 (33.3%)		99 (27.4%)	1 (14.3%)		99 (27.4%)	1 (14.3%)		99 (27.3%)	1 (16.7%)		100 (27.2%)
Weight (kg/m2), Median [IQR]	68.0 [57.0, 77.0]	68.0 [56.0, 79.0]	0.919	68.0 [57.0, 77.0]	59.5 [54.0, 67.3]	0.894	68.0 [57.0, 77.0]	68.0 [57.0, 79.0]	0.995	68.0 [57.0, 77.0]	61.8 [55.1, 76.3]	0.947	68.0 [57.0, 77.0]
Missing data	3 (0.9%)	0 (0%)		3 (0.8%)	0 (0%)		3 (0.8%)	0 (0%)		3 (0.8%)	0 (0%)		3 (0.8%)
Tacrolimus level (ng/ml), Median [IQR]	5.40 [3.70, 7.50]	5.05 [2.98, 6.38]	0.497	5.40 [3.60, 7.70]	5.65 [4.39, 7.18]	0.987	7.00 [4.58, 9.10]	6.35 [6.13, 6.58]	0.934	7.30 [5.30, 8.00]	5.10 [4.40, 5.80]	0.544	5.30 [3.50, 7.50]
Missing data	152 (45.4%)	7 (21.2%)		297 (82.3%)	3 (42.9%)		351 (97.2%)	5 (71.4%)		357 (98.6%)	4 (66.7%)		159 (43.2%)
Tacrolimus level classification, n(%)													
Low	77 (23.0%)	12 (36.4%)	0.974	26 (7.2%)	2 (28.6%)	0.983	3 (0.8%)	0 (0%)	0.499	1 (0.3%)	0 (0%)	0.545	89 (24.2%)
High	39 (11.6%)	4 (12.1%)		12 (3.3%)	1 (14.3%)		4 (1.1%)	0 (0%)		4 (1.1%)	1 (16.7%)		43 (11.7%)
Optimal	67 (20.0%)	10 (30.3%)		26 (7.2%)	1 (14.3%)		3 (0.8%)	2 (28.6%)		0 (0%)	1 (16.7%)		77 (20.9%)
Missing data	152 (45.4%)	7 (21.2%)		297 (82.3%)	3 (42.9%)		351 (97.2%)	5 (71.4%)		357 (98.6%)	4 (66.7%)		159 (43.2%)
Tacrolimus daily dose (mg), Median [IQR]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	0.999	4.00 [4.00, 6.00]	4.00 [2.50, 4.50]	0.268	4.00 [4.00, 6.00]	4.00 [3.50, 4.00]	0.742	4.00 [3.00, 5.00]	6.50 [5.25, 7.75]	0.0206*	4.00 [4.00, 4.00]
Missing data	11 (3.3%)	0 (0%)		31 (8.6%)	0 (0%)		69 (19.1%)	0 (0%)		99 (27.3%)	0 (0%)		11 (3.0%)

Correlating Tacrolimus levels with dose formulation: Implications for toxicity and renal graft rejection

Diference weight adjusted and formulated dose (mg), Median [IQR]	2.70 [1.60, 3.60]	2.80 [1.40, 3.90]	0.913	2.10 [0.625, 3.90]	2.10 [0.725, 4.33]	1	2.08 [0.375, 3.95]	3.10 [2.30, 4.40]	0.995	2.70 [0.900, 4.40]	-0.225 [-1.50, 0.863]	0.511	2.70 [1.60, 3.60]
Missing data	11 (3.3%)	0 (0%)		31 (8.6%)	0 (0%)		69 (19.1%)	0 (0%)		99 (27.3%)	0 (0%)		11 (3.0%)
Micophenolate daily dose (mg), Median [IQR]	2000 [2000, 2000]	2000 [2000, 2000]		2000 [1500, 2000]	1500 [1500, 2000]		1500 [1000, 2000]	1500 [750, 2000]		1500 [1000, 2000]	1750 [1500, 2000]		2000 [2000, 2000]
Non-micophenolate maintance	11 (3.3%)	0 (0%)		47 (13.0%)	0 (0%)		88 (24.4%)	0 (0%)		88 (24.3%)	0 (0%)		11 (3.0%)
Coticoid maintenance, n(%)	33 (9.9%)	7 (21.2%)	0.135	50 (13.9%)	0 (0%)	0.571	50 (13.9%)	1 (14.3%)	0.999	41 (11.3%)	2 (33.3%)	0.25	40 (10.9%)
Prednisolone daily dose (mg), Median [IQR]	5.00 [5.00, 5.00]	5.00 [5.00, 5.00]	0.539	5.00 [5.00, 5.00]	NA	1	5.00 [5.00, 5.00]	5.00 [5.00, 5.00]	0.926	5.00 [5.00, 5.00]	5.00 [5.00, 5.00]	0.929	5.00 [5.00, 5.00]

*Statistically significant with p-value less than 0.05

3.1. Tacrolimus levels and dose correlation

The results revealed that there was no statistical significance between tacrolimus blood level categories and the doses of tacrolimus during the first twelve months. Moreover, tacrolimus blood level categories (decreased, optimal and elevated) presented very similar average doses in every assessment, mostly above 4 mg per day. However, it was observed that when tacrolimus blood levels were decreased, the doses between levels increased, and for elevated blood levels, the doses decreased. The results further revealed a weak correlation ($\rho=0.31$, $p < 0.001$) between the variability of levels and dose, indicating a directly proportional relationship (Figure 1). The complete analysis for the first, third, sixth, and twelfth months can be found in Appendix 1.

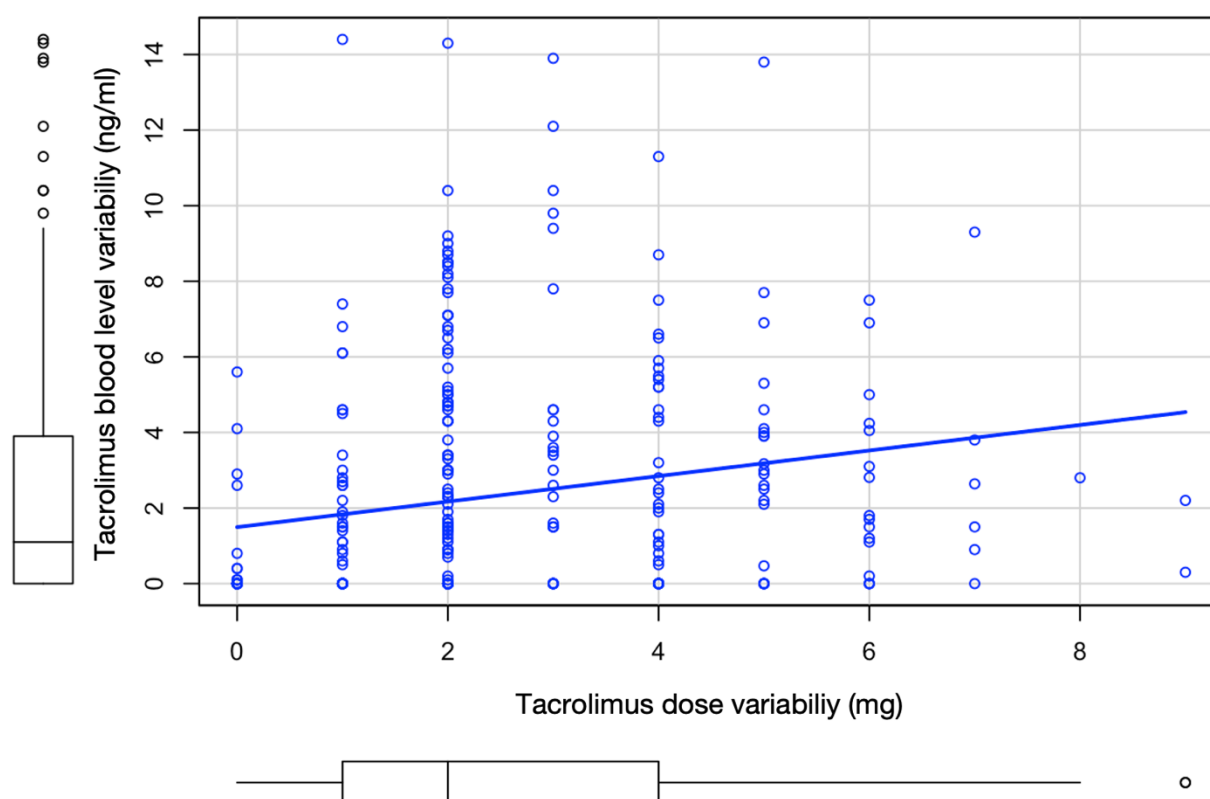


Figure 1. Correlation between tacrolimus blood levels and dose variability.

3.2. Tacrolimus levels and graft rejection association

The results did not reveal statistically significant differences in the bivariate analysis and non-adjusted logistic regression for tacrolimus levels and doses with acute graft rejection. Except for the twelfth-month tacrolimus doses, which were higher in the patients that presented acute rejection the same month (p -value 0.02). The p values for each test are presented in Table 2, and the non-adjusted regression is in Appendix 1.

4. DISCUSSION

Currently, monitoring tacrolimus levels is still considered a useful and decisive tool for individualizing patient treatment; however, the usefulness of monitoring these levels is still unclear. Different studies support a wide and variable range of conclusions. A cohort study in the United States stated that there is an association between tacrolimus levels and biopsy-proven acute rejection, specifically in levels below eight ng/ml [9]. In contrast, another cohort study in Peru found no link between tacrolimus levels and renal function and acute rejection but found that levels higher than 12 ng/ml were associated with early infections in the first post-transplant month [10]. An additional study, although it asserts the absence of an association between levels and rejection, pointing out the limitation in the number of patients included as an influential factor [11]. The present study suggests that tacrolimus levels taken during the first-year post-transplantation and the incidence of graft rejection during this same period are not significantly related; even the number of levels taken, and maximum/minimum levels do not represent a decrease or increase in rejection rates.

Furthermore, populations with equivalent therapies, such as double therapy composed of tacrolimus and mycophenolate, do not result in statistically significant changes in acute rejection. This same result was present in patients with triple therapies, including prednisolone, demonstrating a lack of protection against the incidence of graft rejection. This supports the double therapy immunosuppression maintenance that reduces the possible adverse effects of chronic glucocorticoid use, including diabetes, Cushing syndrome, osteoporosis, and hypertension, among many others [12].

Moreover, the data obtained shows a statistically significant correlation between tacrolimus levels and dose variability but failed to present a significant correlation between each month's doses and levels. We consider these results confirm the relevance of tacrolimus personal variability, which can be related to genetic factors, food, medication, concomitant illnesses, and adherence [13]. In fact, several papers are studying the intra-patient tacrolimus variability and its association to rejection and toxicity [13-16]. Nonetheless, it is still recommended the tacrolimus blood level, especially in the first few weeks after transplantation [17]. This timing is consistent with this study since the greatest number of levels were obtained during the first two weeks and the first month post-transplantation despite the significant percentage of missing data.

When analyzing tacrolimus blood levels by categories, no significant differences were found when comparing the formulated doses. However, it was noticed that in most cases where the levels were decreased, the dose increased, and when the levels were high, the dose decreased. This suggests that there may be a clinical response to tacrolimus levels. But it is crucial to note that, as stated in a study, tacrolimus concentration variations do not provide a clear association or guideline for dose reduction over time [18].

Another significant finding was the relatively low occurrence of toxicity, affecting less than 4% of patients. This outcome could be attributed to two factors: firstly, the limited sample size, which has been observed in other studies investigating these phenomena [14]. Secondly, there may have been an underreporting of toxicity events, considering that the identification of toxicity was based on the review of the patients' clinical histories, since there have not been any report adverse events to the pharmacovigilance group. These observations align with existing literature that indicates a lack of feeding of the system by health professionals, highlighting the need to

identify and work on the causes of underreporting to improve patient safety [19]. It would be worthwhile to review if the underreporting diminishes if the pharmacovigilance group should define tacrolimus toxicity and how it relates to drug doses and levels. On the other hand, it is important to note that Colombiana de Trasplantes uses reduced tacrolimus doses, which may have an influence on tacrolimus levels and toxicity events. Therefore, it would be worthwhile to study reduced doses and total compliance and knowledge of toxicity report with a larger population.

This study is, to our knowledge, the first report on tacrolimus levels and doses, rejection, and toxicity in Colombia. But must be understood within its limitations; first, the missing data regarding tacrolimus levels caused by hospitalization, absence of a request, nephrectomy, graft loss, and death. This was especially true during the first month when all patients were expected to have their levels taken as per the immunosuppression guide.

Additionally, there were significant differences in the level results obtained in short periods, possibly due to various factors such as the technique used in taking the levels, patient taking medication before the test, drug interactions, or the time between taking the sample and the reading. The technique is particularly relevant as the analytical methodology used can be influenced by significant cross-reactivity of metabolites or structural analogues, sample collection time and measurement not only of the free drug but also of the protein-bound drug which, although taken into account, is an important factor to be considered [20, 21]. Second, the non-randomized and small sample size may limit the generalization of these results. Finally, a suspected underreport of the tacrolimus toxicity may affect the incidence of this event.

Finally, a totally influential factor for the type of treatment of renal transplant patients that plays a fundamental role in graft rejection rates is adherence, an aspect that can also influence tacrolimus levels in the event of incorrect administration or lack thereof [22, 23]. As for toxicity, defining the association with the drug continues to be a challenge both for the specialist and for the pharmacovigilance teams since due to the complexity of the treatment and the pathology, there may be other factors that can explain it, such as concomitant drugs or other pathologies, in addition to the absence of information related to it, and the wide range of adverse reactions detailed in the drug's technical data sheet, do not allow for a clear consensus on toxicity associated with tacrolimus.

Among the challenges are the need for further studies according to each factor studied, encouraging the reporting of adverse events that allow grouping and defining toxicity, digital aids that allow easy and complete clinical information on the patient, in addition to the search for other tools, such as pharmacogenetics, which can be both a clinical and economic tool for defining immunosuppressive therapy for patients [7].

5. CONCLUSIONS

In conclusion our study did not find a significant association of tacrolimus blood levels with graft rejection in the first year. Even so, we consider that tacrolimus levels are relevant for the kidney recipient care, but are highly variable between doses, adherence, and pharmacodynamics. On the other side, we found that low toxicity incidence did not vary upon tacrolimus levels but suspect that this phenomenon is affected by underreporting. Emerging the question of the usefulness and

relevance of tacrolimus plasma level monitoring as an effective and determinant approach to mitigate rejection or toxicity rates. Therefore, to answer there is a need to scale this study to a bigger sample size and probably including novel assessments including pharmacogenetic factors, aiming to have a better understanding of the pharmacokinetics in our population and to encourage the adequate report of suspected toxicity events.

CONFLICT OF INTEREST

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

APPENDIX 1.

Table A1. Tacrolimus blood level categorization in the first month

	Decreased (N=89)	Elevated (N=43)	Optimal (N=77)	Total (N=209)	P value
Tacrolimus daily dose - First month (mg)					
Mean (SD)	4.07 (0.636)	4.05 (0.375)	4.08 (0.390)	4.07 (0.505)	0.991
Median [Q1, Q3]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	
Difference weight adjusted and formulated dose (mg)					
Mean (SD)	2.50 (1.46)	2.82 (1.41)	2.70 (1.34)	2.64 (1.40)	0.639
Median [Q1, Q3]	2.60 [1.50, 3.50]	2.90 [1.85, 3.60]	2.70 [1.90, 3.50]	2.70 [1.60, 3.50]	

Table A2. Tacrolimus blood level categorization in the first and third month

	Decreased (N=28)	Elevated (N=13)	Optimal (N=27)	Total (N=68)	P value
Tacrolimus daily dose - third month (mg)					
Mean (SD)	5.00 (1.83)	3.77 (1.24)	4.22 (1.45)	4.46 (1.63)	0.111
Median [Q1, Q3]	5.00 [4.00, 6.00]	4.00 [3.00, 4.00]	4.00 [4.00, 5.00]	4.00 [4.00, 6.00]	
Tacrolimus daily dose - first month (mg)					
Mean (SD)	4.14 (0.932)	4.15 (0.555)	3.93 (0.385)	4.06 (0.689)	0.645
Median [Q1, Q3]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.00]	
Difference weight adjusted and formulated dose (mg)					
Mean (SD)	1.36 (2.53)	3.24 (2.09)	2.70 (2.15)	2.25 (2.40)	0.0672
Median [Q1, Q3]	0.950 [-0.500, 3.05]	3.60 [2.10, 4.50]	2.60 [1.40, 4.50]	2.55 [0.713, 4.15]	

Table A3. Tacrolimus blood level categorization in the third and sixth month

	Decreased (N=3)	Elevated (N=4)	Optimal (N=5)	Total (N=12)	P value
Tacrolimus daily dose - sixth month (mg)					
Mean (SD)	5.67 (1.53)	3.50 (1.00)	4.60 (2.19)	4.50 (1.78)	0.47
Median [Q1, Q3]	6.00 [5.00, 6.50]	4.00 [3.50, 4.00]	4.00 [4.00, 5.00]	4.00 [4.00, 5.25]	
Tacrolimus daily dose - third month (mg)					
Mean (SD)	5.33 (1.15)	4.00 (0)	3.20 (1.64)	4.00 (1.41)	0.22
Median [Q1, Q3]	6.00 [5.00, 6.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [2.00, 4.00]	4.00 [4.00, 4.25]	
Difference weight adjusted and formulated dose (mg)					
Mean (SD)	0.900 (2.70)	3.65 (2.13)	2.53 (3.22)	2.50 (2.74)	0.642
Median [Q1, Q3]	-0.400 [-0.650, 1.80]	3.33 [1.98, 5.00]	2.80 [2.30, 4.70]	2.55 [1.21, 4.63]	

Table A4. Tacrolimus blood level categorization in the twelfth month

	Decreased (N=1)	Elevated (N=1)	Optimal (N=5)	Total (N=7)	P value
Tacrolimus daily dose - twelfth month (mg)					
Mean (SD)	NA	NA	4.20 (1.64)	4.29 (1.38)	0.961
Median [Q1, Q3]	5.00 [5.00, 5.00]	4.00 [4.00, 4.00]	4.00 [3.00, 4.00]	4.00 [3.50, 4.50]	
Difference weight adjusted and formulated dose (mg)					
Mean (SD)	NA	NA	3.09 (1.29)	2.95 (1.12)	0.878
Median [Q1, Q3]	3.15 [3.15, 3.15]	2.05 [2.05, 2.05]	3.30 [2.75, 3.80]	3.15 [2.40, 3.55]	

Table A5. Non adjusted Odds Ratios (OR), confidence intervals (CI) and p value of graft rejection at the first, third, sixth and twelfth.

	1 MONTH GRAFT REJECTION			3 MONTH GRAFT REJECTION			6 MONTH GRAFT REJECTION			12 MONTH GRAFT REJECTION		
	OR	CI 95%	P value	OR	CI 95%	P value	OR	CI 95%	P value	OR	CI 95%	P value
Age (years)	0.98	0.95-1.00	0.180	1.00	0.95-1.06	0.750	0.99	0.94-1.04	0.780	0.94	0.88-1.00	0.083
Sex (Reference Feminine)												
Masculine	1.14	0.55-2.43	0.715	0.98	0.21-5.03	0.98	1.85	0.39-13.1	0.462	0.36	0.04-1.87	0.244
Donor type (Reference Deceased)												
Living non-related	0.74	0.11-2.74	0.706	1.54	0.07-10.02	0.695	Inf	NC	0.99	1.94	0.09-13.66	0.559
Living related	1.34	0.59-2.86	0.459	0.468	0.024		0.38	0.02-2.31	0.385	0.58	0.02-4.03	0.637

Weight (kg/m²)	0.99	0.97-1.00	0.700	0.97	0.92-1.005	0.313	0.99	0.95-1.00	0.920	0.98	0.93-1.00	0.579
Tacrolimus level (ng/ml)**	0.91	0.78-1.04	0.237	0.97	0.64-1.29	0.868	0.91	0.50-1.26	0.699	0.46	0.05-1.24	0.284
Tacrolimus level classification (Reference Optimal)												
Decreased	1.04	0.42-2.62	0.925	2.00	0.18-44.6	0.580	Inf	NC	0.998	Inf	NC	0.998
Elevated	0.68	0.17-2.20	0.548	2.16	0.08-57.9	0.595	Inf	NC	0.998	Inf	NC	0.999
Tacrolimus daily dose (mg)**	1.01	0.49-1.80	0.964	0.65	0.37-1.07	0.105	0.83	0.50-1.28	0.438	1.58	1.11-2.28	0.008*
Difference weight adjusted and formulated dose (mg)**	0.97	0.78-1.04	0.691	1.00	0.76-1.06	0.998	1.00	0.80-1.06	0.919	0.68	0.49-0.93	0.017*
Mycophenolate (Reference No)												
Mofetil	Inf	NC	0.990	Inf	NC	0.992	Inf	NC	0.993	Inf	NC	0.993
Sodium				Inf	NC	1	1	NC	1	Inf	NC	1
Corticoid maintenance (Reference No)												
Yes	2.46	0.92-5.85	0.051	1.41	NC	0.992	1.03	0.05-6.24	0.974	3.91	0.53-20.7	0.122
Prednisolone daily dose (mg)**	0.51	0.13-1.24	0.230	Inf	NC	1	45.5	NC	0.997	Inf	NC	0.996

*Statistically significant with p-value less THAN 0.05

** Taken the same month of the graft rejection

REFERENCES

1. T. Vos, C. Allen, M. Arora, R.M. Barber, A. Brown, A. Carter, *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, **388**(10053), 1545–1602 (2016). Doi: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)
2. F. Giron-Luque, N. Patino-Jaramillo, Y. Baez-Suarez, A. García-López, F. Giron-Luque, N. Patino-Jaramillo, *et al.* The use of intraoperative mannitol during the laparoscopic nephrectomy in living kidney donor and the prevention of delayed graft function. *Urol. Colomb.*, **32**(3), 86–92 (2023). Doi: <http://doi.org/10.24875/ruc.23000029>
3. D.F. Ávila, M. Caicedo, S.J. Echeverry, A.F. Bohórquez, P.K. García, M.A. Nova, *et al.* *Posicionamiento terapéutico para el tratamiento farmacológico de trasplante de riñón*. Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá D. C., Colombia, 2021, 388 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VP/RBC/ipt-trasplante-organo-solido-rinon-2021.pdf>. Accessed on July 16, 2023.
4. E. Peña-Torres & S. Narváez. *Efectividad y seguridad de tacrolimus como inmunosupresión primaria en pacientes con trasplante renal*. Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá D. C., Colombia, 2013, 28 p. URL: [https://www.iets.org.co/Archivos/EyS%20Trasplante%20renal%20\(tacrolimus\).pdf](https://www.iets.org.co/Archivos/EyS%20Trasplante%20renal%20(tacrolimus).pdf). Accessed on July 16, 2023.

5. A.W. Thomson, C.A. Bonham & A. Zeevi. Mode of action of tacrolimus (FK506): Molecular and cellular mechanisms. *Ther. Drug Monit.*, **17**(6), 584–591 (1995). Doi: <http://doi.org/10.1097/00007691-199512000-00007>
6. INVIMA. Listado de principios activos de estrecho margen terapéutico, 2017. URL: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/1232250/Listado-de-Medicamentos-de-Estrecho-Margen-Terapeuticos.pdf/b4c0b80a-e61e-a93a-8195-caca922f9cef?t=1560783097694>. Accessed on July 16, 2023.
7. B. Távira, C. Díaz-Corte, D. Coronel, F. Ortega & E. Coto. Farmacogenética del tacrolimus: ¿del laboratorio al paciente? *Nefrología*, **34**(1), 11–17 (2014). Doi: <http://doi.org/10.3265/nefrologia.pre2013.nov.12267>
8. S. Salcedo-Herrera, J.L. Pinto-Ramírez, A. García-López, J. Amaya-Nieto & F. Girón-Luque. Acute rejection in kidney transplantation and early beginning of tacrolimus. *Transplant. Proc.*, **51**(6), 1758–1762 (2019). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.04.048>
9. K.R. Richards, D. Hager, B. Muth, B.C. Astor, D. Kaufman & A. Djamali. Tacrolimus trough level at discharge predicts acute rejection in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation*, **97**(10), 986–991 (2014). Doi: <http://doi.org/10.1097/TP.0000000000000149>
10. M. Gómez-Luján, M.E. Chambi-Macedo, C. Cruzalegui-Gómez, H. Soto-Huamán, E. Sifuentes-Aguirre & J. Gálvez-Inga. Relationship between tacrolimus dosage and renal function, acute rejection and early infections, single center experience. *Rev. Fac. Med. Hum.*, **18**(2), 21–27 (2018). Doi: <http://doi.org/10.25176/rfmh.v18.n2.1282>
11. M.I. Francke, L.M. Andrews, H.L. Le, D. van de Velde, M. Dieterich, S. Udomkarnjananun, *et al.* Monitoring intracellular tacrolimus concentrations and its relationship with rejection in the early phase after renal transplantation. *Clin. Biochem.*, **101**, 9–15 (2022). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.12.002>
12. J. Gutiérrez-Restrepo. Efectos adversos de la terapia con glucocorticoides. *Iatreia*, **34**(2), 137–150 (2021). Doi: <http://doi.org/10.17533/udea.iatreia.96>
13. H.M. Gonzales, J.W. McGillicuddy, V. Rohan, J.L. Chandler, S.N. Nadig, D.A. Dubay, *et al.* A comprehensive review of the impact of tacrolimus inpatient variability on clinical outcomes in kidney transplantation. *Am. J. Transplant.*, **20**(8), 1969–1983 (2020). Doi: <http://doi.org/10.1111/ajt.16002>
14. L. Schumacher, A.D. Leino & J.M. Park. Tacrolimus inpatient variability in solid organ transplantation: A multiorgan perspective. *Pharmacotherapy*, **41**(1), 103–118 (2021). Doi: <http://doi.org/10.1002/phar.2480>
15. G. Coste & F. Lemaître. The role of intra-patient variability of tacrolimus drug concentrations in solid organ transplantation: A focus on liver, heart, lung and pancreas. *Pharmaceutics*, **14**(2), 379 (2022). Doi: <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020379>
16. H. Kim, A. Han, S. Ahn, S.K. Min, J. Ha & S. Min. Association of high intra-patient variability in tacrolimus exposure with calcineurin inhibitor nephrotoxicity in kidney transplantation. *Sci. Rep.*, **13**, 16502 (2023). Doi: <http://doi.org/10.1038/s41598-023-43755-x>
17. K.L. Lentine, B.L. Kasiske, A.S. Levey, P.L. Adams, J. Alberú, M.A. Bakr, *et al.* KDIGO Clinical practice guideline on the evaluation and care of living kidney donors. *Transplantation*, **101**(8S), S7–S105 (2017). Doi: <http://doi.org/10.1097/TP.0000000000001769>
18. A.L. Robles-Piedras & E.H. González-López. Tacrolimus levels in adult patients with renal transplant. *Proc. West Pharmacol. Soc.*, **52**, 33–34 (2009). URL: https://web.uaeh.edu.mx/investigacion/icsa/LI_UsoMedic/Ana_Robles/tacrolimus.pdf
19. O. Moreno-Mattar, R. Ramírez, A. Alvarado, F. Sierra & J. Guzmán. Report of adverse events in Colombia: A successful case. *Curr. Drug Saf.*, **14**(1), 53–56 (2018). DOI: <http://doi.org/10.2174/1574886313666181109150648>

20. R. Gómez-Lagos. *Recomendaciones para la cuantificación de inmunosupresores en el monitoreo de drogas terapéuticas*. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Santiago, Chile, 2017, 22 p. URL: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20la%20cuantificaci%C3%B3n%20de%20inmunosupresores.pdf>
21. Y.-W. Lee. Comparison between ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and a chemiluminescence immunoassay in the determination of cyclosporin A and tacrolimus levels in whole blood. *Exp. Ther. Med.*, **6**(6), 1535–1539 (2013). Doi: <http://doi.org/10.3892/etm.2013.1325>
22. M. Torres-Gutiérrez, N. Lozano-Suárez, V.A. Burgos-Camacho, J. Caamaño-Jaraba, J.A. Gómez-Montero, A. García-López, *et al.* Is non-adherence associated with adverse outcomes in kidney transplant recipients? The role of non-adherence as a risk and predictor factor for graft loss and death. *Patient Prefer. Adherence*, **17**, 2915–2925 (2023). Doi: <http://doi.org/10.2147/ppa.s436833>
23. M. Torres-Gutiérrez, V. Burgos-Camacho, J.P. Caamaño-Jaraba, N. Lozano-Suárez, A. García-López & F. Girón-Luque. Prevalence and modifiable factors for holistic non-adherence in renal transplant patients: A cross-sectional study. *Patient Prefer. Adherence*, **17**, 2201–2213 (2023). Doi: <http://doi.org/10.2147/ppa.s419324>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

N. Gaitán-Torres, N. Lozano-Suárez, A. García-López, A. Gómez-Montero & F. Girón-Luque. Correlating Tacrolimus levels with dose formulation: Implications for toxicity and renal graft rejection in a cohort of kidney transplant recipients with steroid-free maintenance immunosuppression. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 28–43 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciq-uifa.v54n1.113036>

Barreras de acceso al cannabis medicinal en Colombia. Una revisión narrativa

Guillermo A. Castaño^{1,2a*}, Sandra Carrillo^{3b} & Rafael Malagón^{1c}

¹ Medicann, Cra. 81 B No. 49-14, Medellín, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad CES, Cl. 10A No. 22-04, El Poblado, Medellín, Colombia

³ ASOMEDCAN, Dg. 75B No. 2A-80, of. 406, Medellín, Colombia

Correos electrónicos:

^a gucastano@gmail.com, ^b drsandraccarrillo@gmail.com, ^c r.malagon@javeriana.edu.co

*Autor para correspondência.

Recibido: 5 de marzo de 2024

Corregido: 20 de agosto de 2024

Aceptado: 22 de agosto de 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119551>

RESUMEN

Introducción: En Colombia, desde el 2017, el mercado del cannabis medicinal se encuentra regulado; sin embargo, existen brechas entre la norma, disponibilidad y acceso de los pacientes a productos farmacéuticos con derivados del cannabis, aprobados por el ente regulatorio y que cumplan con los estándares de calidad. **Objetivo:** realizar una síntesis narrativa para identificar elementos que pudieran estar incidiendo en el acceso de medicamentos con derivados de cannabis medicinal de los pacientes. **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, mitos y connotaciones morales que se tiene la marihuana por parte de la población general y los médicos, la falta de entrenamiento de estos últimos. Por otro lado, a nivel institucional y de sistemas de salud se detectaron dificultades en los trámites para acceder a los tratamientos 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 derivados del cannabis a los pacientes que lo requieran

Palabras claves: Cannabis medicinal; barreras de acceso; economía farmacéutica; sistema de salud.

SUMMARY

Barriers to access to medicinal cannabis in Colombia. A narrative review

Introduction: In Colombia, since 2017, the medical cannabis market has been regulated; however, there are gaps between the standard, availability and access of patients to pharmaceutical products with cannabis derivatives, approved by the regulatory body and that meet quality standards. **Objective:** to carry out a narrative synthesis to identify elements that could be affecting patients' access to medicines with medicinal cannabis derivatives. **Methodology:** a narrative review was carried out consisting of five phases: I) bibliographic search, II) review by title and abstract, III) full text review and IV) selection of references and V) descriptive analysis. **Results:** individual barriers to access were identified such as low

purchasing power in patients, myths and moral connotations that marijuana has on the part of the general population and doctors, and the lack of training of the latter. On the other hand, at the institutional and health systems level, difficulties were detected in the procedures to access treatments and poor availability of medicines. **Conclusions:** the findings offer an approach to proposing solutions and alternatives for structuring public health policies that guarantee access to cannabis-derived medicines for patients who require them.

Keywords: Medical cannabis; access barriers; pharmaceutical economics; health system.

RESUMO

Barreiras ao acesso à cannabis medicinal na Colômbia. Uma revisão narrativa

Introdução: Na Colômbia, desde 2017, o mercado de cannabis medicinal é regulamentado; no entanto, há lacunas entre a norma, a disponibilidade e o acesso dos pacientes aos produtos farmacêuticos derivados da cannabis, aprovados pelo órgão regulador e que atendem aos padrões de qualidade. **Objetivo:** realizar uma síntese narrativa para identificar elementos que possam estar influenciando o acesso dos pacientes aos medicamentos contendo derivados medicinais da cannabis. **Metodologia:** Foi realizada uma revisão narrativa composta por cinco fases: I) busca 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 de acesso, como o baixo poder aquisitivo dos pacientes, os mitos e conotações morais que a maconha tem por parte da população em geral e dos médicos, e a falta de capacitação destes últimos. Por outro lado, a nível institucional e do sistema de saúde, foram detetadas dificuldades nos procedimentos de acesso aos tratamentos e baixa 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 aos medicamentos derivados da cannabis para os pacientes que deles necessitam.

Palavras-chave: Cannabis medicinal; barreiras de acesso; economia farmacêutica; sistema de saúde.

1. INTRODUCCIÓN

La planta *Cannabis sativa*, ha sido utilizada desde la antigüedad por diversas culturas con fines medicinales, recreativos, agrícolas, cosméticos e incluso religiosos. Sin embargo, sólo hasta finales del siglo XX con la evolución de la química instrumental se comenzaron a diseñar y realizar estudios científicos más robustos orientados a evaluar los efectos e interacciones moleculares de los compuestos del cannabis cuando se identifica el Sistema Endocannabinoide donde se elucida el receptor CB1 y posteriormente el CB2 que son receptores acoplados a la proteína G. Este descubrimiento es el inicio para identificar el mecanismo de acción y farmacología asociada a los compuestos de mayor proporción en las flores del cannabis los cuales son compuestos terpenofenólicos, denominados de forma genérica como “cannabinoides” [1]. Aunque se han identificado más de 100 de estos metabolitos, los más relevantes son el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) por sus efectos farmacológicos asociados a su capacidad de ligarse e interactuar con múltiples receptores cannabinoides [1].

En esta línea, la disponibilidad de un número creciente de publicaciones en los últimos años, ha documentado actividad antiespasmódica, analgésica, antiemética, neuroprotectora, antiinflamatoria [2] y ansiolítica [3]; apoyando la hipótesis del potencial terapéutico de los preparados farmacéuticos basados en cannabis medicinal, especialmente para enfermedades en las cuales las opciones terapéuticas son limitadas como la epilepsia refractaria [4], la esclerosis múltiple, dolor neuropático crónico [5], el síndrome de emaciación (caquexia) asociado

al SIDA, el control del dolor en pacientes con cáncer y el manejo de náuseas asociadas a la quimioterapia [6].

Sin embargo, se han presentado limitaciones en la investigación y aprobación de productos farmacéuticos derivados del cannabis y, con ello, en su producción, comercialización y utilización; situación que podría atribuirse a tabús, falta de evidencia farmacológica y restricciones normativas que han rodeado a la planta, así como la no inclusión de estos productos medicinales en los planes de beneficios en salud lo que dificulta el acceso de los pacientes a estas opciones terapéuticas, situación que obliga a los pacientes a incurrir en gastos adicionales a parte del pago mensual por la atención y el acceso a medicamentos en las entidades promotoras de salud (EPS) para acceder a tratamientos seguros y confiables con cannabis medicinal que tienen costos considerables dado todo el proceso para contar con productos de alta calidad. Es así, que en muchos casos los pacientes acceden a productos en el mercado informal de muy bajos costos los cuales son elaborados de manera artesanal, sin las adecuadas buenas prácticas de elaboración (BPE), sin trazabilidad y de calidad dudosa que representa un riesgo para los pacientes, considerando que las concentraciones de los ingredientes activos de los productos no son verificadas, los contaminantes microbiológicos y químicos no son cerciorados que se encuentre por debajo de los límites aceptables o ausentes según corresponda.

Es de resaltar que si se amplía la cobertura del seguro médico que incluya el cannabis medicinal, se ampliarían las opciones de tratamiento médico y las EPS experimentarían importantes ahorros de costos. La prescripción de cannabis podría generar aún más ahorros para el presupuesto sanitario. Por ejemplo, hay evidencia que sugiere que el uso de cannabis ha resultado en que el 71,8 por ciento de los pacientes usen menos medicamentos contra la ansiedad, el 66,7 por ciento de los pacientes usen menos medicamentos para la migraña y el 65,2 por ciento de los pacientes usen menos medicamentos para conciliar el sueño [7].

Todo lo anterior plantea la necesidad de establecer lineamientos estratégicos, gubernamentales y académicos, orientados a favorecer la generación, difusión y apropiación de evidencia de los resultados en salud alcanzados con el uso de esta terapia medicamentosa, específicamente en condiciones en las cuales se puede establecer una clara relación riesgo/ beneficio, incluyendo estudios de farmacoeconomía para establecer también la relación coste/beneficio, este último aspecto de mucho interés para el sistema de salud y las aseguradoras.

2. METODOLOGÍA

Para dar alcance al objetivo del presente trabajo se procedió de la siguiente manera:

2.1. 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*"), "Access barriers" AND ("Medical cannabis*" OR "Cannabinoides", OR "Medical marijuana"). Español: "Acceso a medicamento*" OR "Acceso a* tratamiento*", "barreras de acceso") AND ("Cannabis medicinal" OR "Cannabinoides"), OR "Marihuana medicinal".

El rango de tiempo definido para la búsqueda fue entre el 2000 y el 2023; artículos en inglés y español que hicieran referencia al tema sin importar el diseño metodológico. Se definieron los siguientes criterios de inclusión: artículos que permitieran identificar factores, alternativas o variables que evidenciaran de qué manera se da el acceso a medicamentos con base en derivados de cannabis.

2.2. 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.

2.3. 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.

2.4. 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®.

2.5. 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.

2.6. Resultados y discusión Referencias incluidas en la revisión

Se recuperaron 185 referencias al aplicar las ecuaciones de búsqueda en las diferentes bases de datos y finalmente después de aplicados los filtros solo quedaron 96, siendo eliminados los documentos duplicados, los que no concretaban el tema, los excluidos por título y resumen, los que no aportaban a dar respuesta a la pregunta.

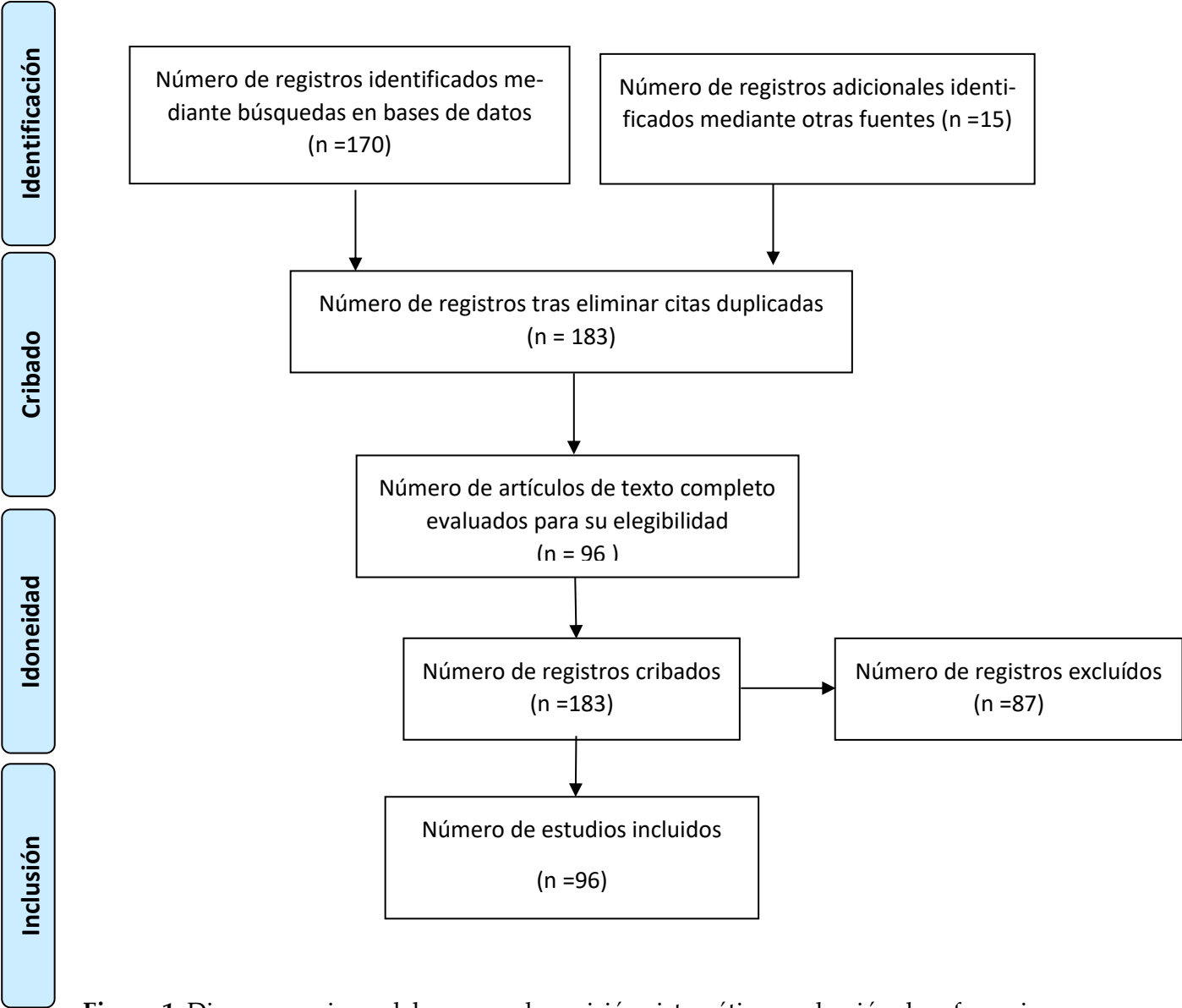


Figura 1. Diagrama prisma del proceso de revisión sistemática y selección de referencias para el análisis de Barreras de acceso al cannabis medicinal en Colombia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez integradas todas las fuentes, se establece organizar la evidencia encontrada en los siguientes apartados temáticos: a) estigma del cannabis, b) normatividad, c) falta de entrenamiento al personal de salud, d) altos costos de producción, e) no entrega por parte del sistema de salud (dudas frente a la evidencia y falta de análisis de coste/efectividad)

3.1. Estigma del cannabis

Ryan y Sharts-Hopko [8] revisaron la investigación cualitativa existente sobre las experiencias de los consumidores de cannabis medicinal en Europa y Estados Unidos, y el estigma y el riesgo surgieron como los temas principales. El estigma se relacionaba tanto con la forma en que los usuarios recetados sentían que los demás percibían su consumo de cannabis medicinal (y la preocupación de estar asociados con representaciones estereotipadas de consumidores

de cannabis recreativo), como con la preocupación sobre cómo los profesionales médicos percibirían su uso de cannabis medicinal (donde había una falta de conocimiento sobre los beneficios potenciales del cannabis y un énfasis desproporcionado en los riesgos potenciales). El riesgo se expresó en relación con el estatus ilícito de la droga en algunos países o estados, así como también se sopesaron los riesgos del uso de cannabis medicinal frente a los efectos secundarios conocidos y los beneficios de los medicamentos recetados convencionales. El riesgo también figuraba en los resultados negativos que experimentaron algunos usuarios, como efectos adversos en la cognición o el equilibrio cuando la dosis era demasiado alta, lo que también se relacionaba con el estigma asociado con el consumo recreativo de cannabis y los estereotipos. Hulaihel *et al.* [9] realizaron entrevistas con una muestra de 15 consumidores de cannabis medicinal en Israel que también sintieron el estigma social como resultado de consumir cannabis medicinal, lo que afectó negativamente su sentido y presentación de sí mismos. Schlag *et al.* [10] realizaron entrevistas con 11 familias en el Reino Unido con niños a quienes se les había recetado cannabis medicinal para la epilepsia. Los hallazgos de esta cohorte específica pusieron en primer plano las frustraciones con respecto a la política nacional y la regulación del cannabis medicinal, y los desafíos experimentados debido a la falta de conocimiento y comprensión del cannabis medicinal dentro del sistema sanitario más amplio del Reino Unido.

Con respecto a las preocupaciones de los médicos para prescribir cannabis medicinal, una revisión sistemática realizada por Gardiner *et al.* [11] sobre las creencias, conocimientos y preocupaciones de los profesionales de la salud en torno al uso de cannabis, los autores concluyeron que los profesionales de la salud generalmente apoyaban el uso de cannabis medicinal en la práctica clínica, pero carecían de confianza y competencia autopercebida; carecía de conocimiento autopercebido sobre cannabis en los ámbitos legislativo y clínico; y que su mayor preocupación estaba relacionada con los efectos adversos psiquiátricos, la adicción y el daño social causado por el uso recreativo indebido de esta sustancia.

3.2. Normatividad Colombiana

Para el caso de Colombia, se expide la ley 1787 en el año 2016 desde el congreso de la república como marco regulatorio y es desde allí que en el año 2017 el Ministerio de Salud y Protección Social reglamenta a través del decreto 613, la resoluciones 2891 y 2892 los aspectos relacionados con acceso, tarifas, licencias y acceso a cupos para cultivo, fabricación de derivados y por su parte el ministerio de justicia y del derecho complementa a través de las resoluciones 577, 578 y 579 lo faltante con respecto a licencias de cultivo, al final esta normativa fue la que dio el primer paso para la regulación del cultivo, producción, importación, exportación, uso médico y científico del cannabis, entre otras.

Sin embargo, quedaron vacíos normativos con respecto al cannabis no psicoactivo y los subsecuentes productos o materia prima obtenida a partir de las flores de cannabis ya que en los procesos de fabricación al concentrar los metabolitos del cannabis de una flor no psicoactiva se pueden obtener derivados psicoactivos (> 1% de THC), desconociéndose el proceso regulatorio para la autorización de este tipo de derivados. Esta situación entre otros vacíos normativos fueron subsanados con la emisión por parte del ministerio de salud y de protección social del Decreto 811 en el año 2021 y las resoluciones conjuntas entre los ministerios de Salud y Protección Social, de Justicia y del Derecho y, Agricultura y Desarrollo Rural 227 y 539 del año 2022, que actualizaron el marco regulatorio donde se contemplan múltiples que da claridad sobre procedimientos en cuanto a licencias, sistemas de previsiones de estupefacientes (cupos), publicidad, usos industriales, importaciones y exportaciones de cannabis psicoactivo y no psicoactivo y amplia las vigencias de licencias y cupos de flor y derivados.

Como parte integral de este marco normativo se cuenta con capítulo exclusivo de productos terminados que contempla preparaciones magistrales (que no requieren registro sanitario), medicamentos, fitoterapéuticos (que requieren registro sanitario, según su marco regulatorio de cada categoría) [12], los cuales deberán justificar su utilidad terapéutica a través de estudios clínicos que garanticen su seguridad y eficacia; y que serán productos fiscalizados de conformidad con el límite de definido por el ministerio de salud y protección social (que contengan una cantidad igual o superior a 2 mg de THC en formas de presentación dosificada tableta, cápsulas o similar, o por cada gramo o mililitro en caso de soluciones, cremas y similares) [13], lo que define las condiciones de prescripción y dispensación de estos productos.

Por otro lado, en la reglamentación inicial del Decreto 613 de 2017 se había contemplado que a través del Ministerio de Salud y Protección Social se expedirán los listados de productos terminados que se clasificarán como de control especial, así como las guías y protocolos de atención a pacientes que necesiten productos que contengan cannabis. Sin embargo, estos protocolos mientras estuvo vigente el mencionado decreto no fue emitida algún protocolo o guía de práctica clínica que orientara a los médicos en cuanto qué tipo de pacientes, para qué tipo de patologías pudieran prescribirse, posologías y demás aspectos farmacológicos que ayuden al seguimiento y control que se debe realizar a los pacientes que lo usen; por otra parte, en la actualización de la reglamentación expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social, decreto 811 de 2021 se menciona nuevamente que *“El Instituto de Evaluaciones Tecnológicas en Salud -IETS- de acuerdo con sus funciones y competencias, establecerá las guías y protocolos de atención a pacientes con productos terminados con fines médicos.”* [12]. Es así que se espera sean materializadas estas propuestas que, en su conjunto, se ven como temas nucleares para la consolidación del sector productivo, atención informada a los pacientes y claridad al personal sanitario de estas terapias con derivados de cannabis pues con ello se tendría seguridad, claridad y seguimiento integral a los pacientes con esta alternativa terapéutica. Por tal razón, resulta prevalente establecer lineamientos para la prescripción y seguimiento de los pacientes que usan cannabis medicinal. Esta estrategia se debe acompañar del seguimiento y registro de los resultados de efectividad y seguridad alcanzados en los pacientes que lo usan bajo prescripción médica, con la especificación del producto empleado.

Una de las consideraciones del gobierno nacional para el acceso informado a medicamentos con cannabis fue que en el corto plazo no se tendrían una amplia gama de terapias de medicamentos o productos fitoterapéuticos con sus respectivos estudios clínicos para asegurar la correspondiente evidencia farmacológica y la obtención del registro sanitario de conformidad con la normativa aplicable a cada categoría de producto. Reflejo de ello es que en la actualidad solo existen 3 medicamentos con registro sanitario entre ellos un nabiximol de 27 mg de THC y 25 mg de CBD/ml en presentación de aerosol bucal indicado en el tratamiento coadyuvante para la mejoría de los síntomas en pacientes con espasticidad moderada o grave debida a la esclerosis múltiple (EM), cuatro soluciones orales de 100 mg de CBD/ml, uno en capsula blanda por 100 mg de CBD y uno en capsula blanda por 200 mg de CBD indicados para el tratamiento complementario de crisis asociadas con síndrome de Lennox-Gastaut (SLG), síndrome de Dravet (SD) o el complejo de esclerosis tuberosa (CET). Fitoterapéuticos se tienen 3 productos con evaluación farmacológica, pero a la fecha no se ha obtenido sus respectivos registros sanitarios. Y es aquí donde las preparaciones magistrales cobran relevancia en relación a contar con un medicamento a corto plazo para los pacientes con calidad verificada en cuanto contenidos de principios activos, ausencia de contaminantes y formas farmacéuticas estables. En este contexto, el INVIMA publicó una guía relacionada con las condiciones/requisitos para la certificación de las Buenas Prácticas de Elaboración [14]. Sin embargo, este tipo de productos por cumplimiento de requisitos técnicos de elaboración, controles de calidad y

materias primas e insumos de producción los costos están siendo muy elevados incluyendo los impuestos al consumo e impuestos de valor agregado (IVA), en el caso de los derivados del cannabis, situación que dificulta el acceso por parte de los pacientes a este tipo de terapias porque al final del proceso de elaboración el producto farmacéutico resulta en unos precios poco atractivos tanto para el sistema de salud como para el propio paciente en relación costo/beneficio con otras alternativas terapéuticas que pueden tener mayor cantidad de efectos adversos pero sopesa el poder adquisitivo volviéndose medicamentos para un grupo muy reducido a pesar de sus beneficios.

Desde esta perspectiva se considera necesario que el gobierno nacional lidere en coordinación con la academia y el sector productivo, el desarrollo de preparados farmacéuticos a base de cannabis con costos accesibles y reconsidere las cargas tributarias a las que están expuestas las terapias medicamentosas desarrolladas en el país no solo para los pacientes, sino para el sistema de salud. Esto podría ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes y quizás, reducir los sobrecostos (por aumento de medicamentos prescritos, consultas reiteradas a especialistas y estancias hospitalarias prolongadas) asociados al poco control de enfermedades como el Síndrome de Lennox-Gastaut, espasticidad asociada a esclerosis múltiple para el que ya están aprobados el uso de estos medicamentos. Pero que aún falta más apoyo para enfermedades asociadas a dolor crónico, dolor neuropático, migraña, insomnio crónico, glaucoma entre otros. Considerando que la industrialización del cannabis medicinal es el primer paso en el desarrollo de industria farmacéutica para Colombia desde la creación de un ingrediente farmacéutico activo ya que la gran mayoría de medicamentos en Colombia son manufacturados con ingredientes activos importados.

Otro hito lo ha constituido la resolución 2808 del 2022 del Ministerio de Salud que incluyó, dentro de los planes de beneficios en salud, el cannabis medicinal [15], autorizando su uso para nueve situaciones concretas:

- La fibromialgia, que causa dolor y sensibilidad muscular generalizados.
- Epilepsia refractaria (tipo síndromes de Lennox-Gastaut, Dravet y Doose).
- Trastorno del sueño y trastorno del sueño y del apetito.
- Insomnio crónico.
- Dolor crónico no asociado a cáncer.
- Dolor neuropático crónico.
- Dolor lumbar.
- Dolor crónico asociado a cáncer.
- Caquexia por cáncer.

Finalmente, y de importancia trascendente, fue la sentencia de la corte constitucional, mediante sentencia T-451 de 2023 [16], que obligo a una EPS ante tutela de 02 demandantes, a autorizar la entrega de los productos a base de cannabis medicinal a las pacientes, en las dosis, cantidades y con la periodicidad ordenadas por el médico tratante, a efectos de garantizar la continuidad del tratamiento prescrito. Igualmente, la Corte exhortó al Ministerio de Salud y al Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud (IETS) que adelanten las gestiones administrativas para garantizar a los usuarios el acceso al uso del cannabis medicinal y sus derivados, conforme lo establecido en la normatividad existente, sin que sea admisible interponer obstáculos sobre el particular.

3.3. Falta de entrenamiento por parte del personal de salud

Un estudio de residentes y becarios de la Universidad de Washington reportó que la mayoría de los decanos informó que sus graduados no estaban preparados para recetar cannabis medicinal, como tampoco para responder preguntas sobre uso medicinal del cannabis. La gran

mayoría de los residentes y becarios (89,5%) no se sintieron capacitados para recetar cannabis medicinal, mientras que el 35,3% no se sintieron preparados para responder preguntas sobre el tema a los pacientes. El 84,9% informó que no recibió educación en la escuela de medicina o residencia sobre cannabis medicinal [17]. En el caso de Canadá los usuarios comentan que es difícil encontrar un médico que respalde su solicitud para acceder al uso de cannabis medicinal (Belle-Isle *et al.* [18]). De otro lado los farmacéuticos de Minnesota se auto-reportan con conocimiento limitado de las políticas y regulaciones de uso del cannabis medicinal y consideran que están inadecuadamente capacitados en farmacoterapia de cannabis, por lo cual se necesita más instrucción y educación sobre los aspectos regulatorios y clínicos del cannabis [19]. Parte de la razón de esto, es que solo el 9% de los currículos de las facultades de medicina documentan contenido sobre el cannabis medicinal en la base de datos del Inventario de currículos de la Asociación de Facultades de Medicina Estadounidenses (AAMC), según el estudio.

En esta misma línea, el estudio de Moeller *et al.* [20], también realizado en EE.UU., encontró que los estudiantes han recibido poca información acerca del uso de la marihuana medicinal en el plan de estudio y el 90% está de acuerdo en que deberían recibir educación acerca de este tema

Por su lado, Carlini *et al.* [21], informa que los proveedores de atención médica a menudo no tienen suficiente información sobre el sistema endocannabinoide y el papel que puede desempeñar en la atención médica.

En nuestro país según la Federación Médica Colombiana [22], parte de la baja prescripción de cannabis medicinal se relaciona con que los médicos no están lo suficientemente informados sobre sus beneficios. Igualmente, muy pocos médicos saben que la Resolución 2292 de 2021 del Ministerio de Salud de Colombia, ha incluido en el Plan de Beneficios en Salud (llamado anteriormente POS) medicamentos y fórmulas magistrales con CBD y THC, dos de las sustancias que se encuentran en el cannabis. Es decir que las Empresas Promotoras de Salud (EPS) podrían estar asegurando la entrega de estos medicamentos a miles de pacientes que los están necesitando y pagando de su bolsillo.

De otro lado, un estudio realizado por Lopera-Londoño *et al.* [23], donde se aplicaron 374 encuestas, 232 (62%) estudiantes de pregrado de Química Farmacéutica y Tecnología en Regencia de Farmacia y 142 (38%) de Medicina., el 60,2% de los estudiantes dicen tener un conocimiento inadecuado sobre la utilización del cannabis medicinal, la utilización de cannabinoides medicinales, la reglamentación y la seguridad. Relacionado con la opinión sobre la utilización medicinal, 356 (95,2%) de los encuestados estuvieron de acuerdo con prescribirla.

Con respecto a las acciones de formación en Colombia, son pocos los esfuerzos que ha habido desde el Estado con la comunidad médica por lo que aún surgen dudas de la posibilidad de que los profesionales de la salud receten medicamentos a base de cannabis. La socialización de esta nueva regulación, el entrenamiento a los médicos se ha hecho por parte de las mismas empresas y algunas Universidades ofreciendo, cursos, seminarios y diplomados. Aunque este trabajo es necesario para sensibilizar a la población sobre el cannabis medicinal y desmitificar el uso de los derivados, el hecho de que esta socialización provenga de las mismas compañías se ve más como una estrategia de mercadeo que una labor educativa.

3.4. Altos costos de producción

En el proceso de desarrollo de la producción del cannabis medicinal existen cadenas productivas verticales, dado que, los mismos productores cuentan con las áreas de cultivo, procesamiento y venta, esto con la finalidad de perfeccionar la técnica productiva y de una manera singular perfeccionar el producto a fin de buscar ventajas competitivas en el mercado, debido

a la creciente competencia en el mercado, conforme a la globalización y a la inversión extranjera en la producción del cannabis medicinal.

La cadena productiva del cannabis medicinal inicia desde la selección adecuada de la semilla considerándose las buenas prácticas agrícolas para plantas medicinales hasta la fabricación de los derivados como ingredientes farmacéuticos activos bajo lineamientos de las buenas prácticas de manufactura donde se integran varios actores desde los cultivadores, transformadores, comerciantes y laboratorios que realizan un trabajo integral en la intención del procesamiento de las flores del cannabis y el aprovechamiento de subproductos [24].

Los costos de cada una de las fases, son altos y el producto final para los pacientes por tanto también es elevado. En él se incluyen el valor de las licencias, los costos y adecuación de las semillas y los terrenos para los cultivos, que para el caso del cannabis psicoactivo (> al 2% de Tetrahidrocannabinol) es oneroso por las medidas de seguridad que pide la norma. La fase de mayor control y desarrollo tiene que ver con la extracción de derivados para su aprovechamiento y la última fase, la terminación del producto que culmina todo el proceso farmacéutico de cannabis con fines medicinales, que para el caso colombiano el mercado cuenta con una escasa oferta de productos con registro sanitario para dos patologías específicas y para el otro universo donde se ha reportado uso solo están autorizados los preparados magistrales, ya que los altos costos que involucran los estudios clínicos dificulta contar con medicamentos de manera masiva seguros y eficaces.

Al indagar sobre las inversiones para la producción de cannabis medicinal desde la selección y producción de semillas, procesamiento, investigación y desarrollo, que culmine con el producto como tal, se ha señalado que algunas empresas han invertido hasta entre 30 y 50 millones de dólares [25].

Actualmente, según los últimos datos otorgados por el INVIMA (2024), sobre las licencias de fabricación de derivados de cannabis medicinal, hay 29 productos que cuentan con un registro sanitario vigente, pero solo hay dos clasificados en la categoría de medicamentos que están reportados con su respectivo registro sanitario: el Sativex con CBD y Tetrahidrocannabinol (THC), importado por GW PHARMA LIMITED, y el Neviot de 100 y 200 mg, producido por la empresa colombiana Procaps. Sin embargo, hay otros dos que se encuentran en estudio, que son el Trunerox de 100 mg, desarrollado por Avicanna Latinoamérica (Santa Marta), y el Cannepi, de la farmacéutica colombiana Novamed [26]. Al momento de escribir este artículo hay tres fitomedicamentos en evaluación farmacológica, pero a la fecha no han obtenido sus respectivos registros sanitarios

La preparación de fórmulas magistrales tiene una reglamentación estricta: las preparaciones deben ser realizadas por un químico farmacéutico y dirigidas hacia un paciente específico que cuenta con prescripción médica. Estos productos no pueden ser promocionados ni publicitados, y para su preparación se debe contar con los siguientes requisitos: i) certificado de cumplimiento de Buenas Prácticas de Elaboración (BPE), otorgado por el INVIMA, y que incluya la realización de magistrales a base de cannabis; ii) comprobante de inscripción ante el Fondo Nacional de Estupefacientes (FNE); iii) la materia prima para las preparaciones magistrales solo puede ser proveída por personas naturales o jurídicas que tengan licencia de fabricación de derivados de cannabis en modalidad de uso nacional y hayan sido fabricados en el marco de los cupos otorgados [27].

Otros de los costos que hay que sumarle al producto final son los originados por los controles de calidad que involucran estudios de estabilidad, validaciones de técnicas analíticas para cuantificar derivados en determinadas formas farmacéuticas, análisis fisicoquímicos incluyendo la cuantificación de los principios activos, verificar la inocuidad de la preparación farmacéutica a través de análisis microbiológicos y de asegurar límites inferiores o ausencia

de contaminantes químicos. Análisis exigidos por el INVIMA cuidando la trazabilidad del producto y la calidad y seguridad de los mismos, los cuales para el lanzamiento de un producto deberán realizarse mínimo a tres lotes de producción situación que pueden alcanzar, los \$7000 USD.

Finalmente, al producto final hay que sumarle, los impuestos; 19% del IVA para la materia prima y del impuesto nacional de consumo de cannabis que es del 16% [28].

En términos del mercado esta situación se ve como una barrera para el acceso a medicamentos a base de cannabis medicinal, dado que en el momento los costos de un preparado magistral para un paciente y con un contenido de 30 ml, para uso sublingual, tiene un costo entre los \$30 USD y \$70 USD, dependiendo si es un preparado magistral con base en cannabidiol -CBD- o si incluye tetrahidrocannabinol -THC-, limitando el posible beneficio que este tipo de productos podría generar en algunos grupos de pacientes. Por lo que una oferta limitada de medicamentos y productos fitoterapéuticos autorizados con registros sanitarios, sumado al elevado costo de los preparados magistrales. Favorece al acceso de productos de dudosa procedencia, elaborados en lugares sin certificación en Buenas Prácticas de Elaboración, situación que genera dudas en cuanto los procesos de fabricación y calidad que garanticen contenidos de ingredientes activos e inocuidad tanto de materias primas como de productos farmacéuticos terminados, lo que se convierte en un riesgo en salud pública.

3.5. No entrega por parte del sistema de salud

Como se indicó anteriormente los desarrollos de la normatividad relacionada con el cannabis medicinal en Colombia, se inician en el 2016, con la ley 1787, mediante la cual se crea un marco regulatorio que permita el acceso seguro e informado al uso médico y científico del cannabis y sus derivados en el territorio nacional colombiano [29]. Los primeros preparados magistrales salen al mercado a finales del año 2020 y desde entonces los pacientes pueden acceder a estos fármacos, pero accediendo a los preparados farmacéuticos por cuenta propia.

El sistema de salud, representado en las Empresas Prestadoras de Salud – EPS-, sin embargo, no asume la atención de pacientes que buscan en el cannabis medicinal una alternativa para sus dolencias, como tampoco la entrega del preparado magistral. Entre sus argumentos: la falta, según ellos, de evidencia científica; las dudas sobre el coste/efectividad y que los productos derivados del cannabis, en el marco de la normatividad vigente para usos medicinales, no estaba incluido en los Planes Básicos de Salud.

En relación a la falta de evidencia científica, si bien agencias internacionales como la FDA que orienta y al que siguen las demás instancias de vigilancia sanitaria y de control de calidad de los medicamentos, productos biológicos, alimentos, bebidas, cosméticos, del mundo, el cannabis como agente terapéutico no ha sido revisado ni aprobado con la excepción de los productos sintéticos de THC Marinol, Cesamet, Syndros y de origen vegetal con CBD – Epidiolex y Sativex con THC y CBD, ha surgido, sin embargo evidencia clínica de calidad moderada a alta que establece la eficacia del cannabis para ciertas aplicaciones terapéuticas, entre ellas: Caquexia por cáncer y VIH; Náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia; Dolor crónico; Espasticidad (por esclerosis múltiple o lesión de la médula espinal); Reducción de la frecuencia de las convulsiones en epilepsia refractaria; Insomnio crónico

Existe también información sobre la seguridad del cannabis [30], pero la investigación actual no abarca por completo todas las formulaciones disponibles de cannabis ni todas las afecciones y poblaciones tratadas con cannabis. Por tanto, la evidencia actual sobre la eficacia y seguridad del cannabis y los cannabinoides tiene una aplicación limitada.

Pese esta limitación, guías clínicas para la prescripción de cannabis medicinal han sido publicadas por la Asociación de médicos de familia de Canadá [31]; Colegio de médicos y

cirujanos de Alberta [32]; las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de los EE.UU. [33]; Departamento de Salud de Queensland [34]; Ministerio de Salud, Bienestar y Deportes Países Bajos [35]; Consenso de expertos de la Sociedad Canadiense del SIDA [36]; Departamento de Salud de Minnesota [37]; Sociedad de Médicos Clínicos de Cannabis [38]; Guías NICE [39]; Ministerio de Salud de Israel [40]; Departamento de Salud de Utah [41]; Departamento de Salud de Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud – IETS/Ministerio de Salud de Colombia [42].

Las guías funcionan con la mejor información científica disponible, que está limitada por las restricciones a la investigación del cannabis. Por lo tanto, muchas condiciones calificadas probablemente se incluyeron en las guías debido a investigaciones preclínicas prometedoras (incluidas investigaciones en animales y muestras aisladas de células/tejidos), evidencia anecdótica, estudios de casos, estudios longitudinales y consenso de expertos.

En las Guías clínicas publicadas, se incluyen más de 60 condiciones calificadas, las más comunes de las cuales se indican en la Tabla 1. Algunas de las condiciones tienen alguna evidencia científicamente respaldada de la eficacia del cannabis para abordar los síntomas, mientras que otras no. Se dispone de evidencia de calidad moderada a alta a través de múltiples estudios sobre el tratamiento eficaz con cannabis para las siguientes afecciones:

- Caquexia (Abrams *et al.* [43]; Andries *et al.* [44]; Haney *et al.* [45]; Haney *et al.* [46]; Timpone *et al.* [47]).
- Náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia (Meiri *et al.* [48]; Söderpalm *et al.* [49]).
- Dolor (resultante de cáncer o artritis reumatoide) (Blake *et al.* [50]; Johnson *et al.* [51]).
- Dolor crónico (resultante de la fibromialgia) (Skrabek *et al.* [52]).
- Neuropatías (resultantes del VIH/SIDA, esclerosis múltiple o diabetes) (Langford *et al.* [53]; Turcotte *et al.* [54]; Wallace *et al.* [55]).
- Espasticidad (por esclerosis múltiple o lesión de la médula espinal) (Pooyania *et al.* [56]).
- Reducción de la frecuencia de las convulsiones (para el síndrome de Dravet y el síndrome de Lennox-Gastaut) (Devinsky *et al.* [57]; Thiele *et al.* [58]; Programa clínico Epidiolex de GW [59]).

Dos condiciones adicionales muestran investigaciones prometedoras, pero la evidencia se limita a un estudio de calidad moderada a alta cada uno para la reducción de las pesadillas del trastorno de estrés postraumático (TEPT) [60] y la mejora de los tics (para el síndrome de Tourette) [61]. Estas condiciones requieren investigación adicional para verificar los hallazgos de los estudios.

El cannabis puede ser eficaz para otras afecciones; sin embargo, las investigaciones disponibles de calidad moderada a alta no han demostrado una eficacia adicional hasta la fecha. Las mejoras en otros síntomas podrían atribuirse a los efectos más generales del cannabis, como la sedación, la estimulación del apetito y la euforia. En lugar de que el cannabis trate los síntomas subyacentes, estos efectos generales del cannabis pueden ayudar a enmascarar los síntomas y aumentar una sensación subjetiva de bienestar, lo que podría mejorar la calidad de vida autoinformada en algunos pacientes [62, 63].

Tabla 1. Patologías más comunes incluidas en las Guías clínicas de cannabis medicinal

Las condiciones de calificación más comunes las Guías Clínicas de cannabis medicinal
• La esclerosis lateral amiotrófica • Caquexia por cáncer y VIH • Cáncer terminal • Enfermedad de Crohn y otros síndromes del intestino irritable • Epilepsia/convulsiones • Glaucoma • VIH/SIDA • Esclerosis múltiple • Náuseas por quimioterapia • Dolor crónico • Espasmos musculares persistentes • Trastorno de estrés postraumático

Fuente: Elaboración propia.

Estas guías constituyen instrumentos importantes para farmacéuticos y profesionales de la salud dado que proporcionan información sobre cómo aconsejar a los pacientes de manera efectiva sobre su uso. Aunque aún está pendiente la evaluación de la utilidad de estas guías en el manejo de los pacientes, las mismas pueden considerarse como referencia en Colombia para el uso de derivados del cannabis en las patologías ya estudiadas.

Con respecto a la farmacoeconomía, la importancia de esta se fundamenta en varios aspectos: optimización de prescripción médica, papel crucial en la comercialización y la distribución de medicamentos, capacidad de mostrar un amplio panorama del impacto social y económico de las enfermedades, como de abrir perspectivas de investigación en varios campos del conocimiento. Dentro de los tipos de estudios farmacoeconómicos se encuentran los que expresan la unidad de ingreso (costos) en términos monetarios y los resultados en unidades monetarias, naturales o de utilidad: reducción de costos (costo minimización), costo beneficio, costo utilidad y costo efectividad, como también los que estudian el panorama global de las enfermedades (análisis costo de la enfermedad). En general, los costos en salud se distribuyen de la siguiente manera: costos directos (médicos y no médicos), indirectos (impacto en la sociedad como unidad productiva) e intangibles (relacionados con calidad de vida de pacientes y familiares). La farmacoeconomía permite una mejor práctica clínica, sistemas de salud más eficientes y un consumo de recursos más racional [64].

En relación con el cannabis medicinal, en los EE.UU., cada año, a medida que más estados adoptan esquemas legislativos que permiten el uso de marihuana medicinal, se expande el número de personas que pueden beneficiarse de ella como opción de tratamiento. En consecuencia, los posibles ahorros de costos asociados con el cannabis medicinal como alternativa al tratamiento con medicamentos recetados también aumentan con la aprobación estatal. Un plan que incluye opciones tanto de marihuana medicinal legalizada como de medicamentos recetados tradicionales permite a los pacientes elegir entre las dos opciones.

Con respecto a la falta de estudios de costo/efectividad, si bien en Colombia no existen estudios de farmacoeconomía relacionados con el cannabis medicinal, una revisión bibliográfica, muestra los siguientes resultados, que sin duda pueden ser extrapolados al Sistema Sanitario Colombiano.

Un estudio de Washington (Estado) de 2017 examinó la elección de los individuos entre medicamentos recetados y cannabis como alternativas de tratamiento cuando ambas opciones estaban disponibles [65]. De las 2774 personas de la muestra, 1248 (46%) de los participantes

informaron haber consumido cannabis como sustituto de los medicamentos recetados. Más comúnmente, el cannabis de uso médico fue sustituido por narcóticos/opioides (35,8%), y los ansiolíticos/benzodiazepinas (13,6%) y los antidepresivos (12,7%) [65].

En perspectiva, en 2019 se emitieron más de 153 millones de recetas de opioides para estadounidenses (incluso después de caer a la tasa de dispensación de opioides más baja en catorce años). Esto representa aproximadamente 46,7% recetas dispensadas por cada 100 personas. Corroborando la reducción en el uso de opioide derivada del cannabis medicinal, dos estudios recientes publicados en el *Journal of the American Medical Association (JAMA) Internal Medicine* encontraron que la reducción en el uso de opioides fue bastante significativa después de la legalización del cannabis medicinal. El primer estudio de *JAMA Internal Medicine* examinó un análisis longitudinal del número de recetas de opioides surtidas bajo la Parte D de Medicare. Este análisis reveló que cuando las leyes sobre cannabis medicinal entraron en vigor en un estado determinado, las recetas de opioides se redujeron en 2,21 millones dosis diarias administradas por año. De manera similar, cuando se abrieron los dispensarios médicos de cannabis, el número de recetas de opioides cayó aún más, en 3,74 millones de dosis diarias por año [65].

En relación con otros medicamentos, un estudio realizado en el 2019, por el Instituto de Investigación Social de la Universidad de Michigan también encontró que el 44% de los consumidores de marihuana medicinal dejaron de tomar una droga farmacéutica o redujeron el uso de uno o ambos, después de comenzar con cannabis medicinal [66]. Cuando se les da a elegir entre cannabis medicinal y recetas farmacéuticas tradicionales, una porción significativa de pacientes opta por el cannabis medicinal como opción de tratamiento.

Por su lado, el trabajo de Bradford y Bradford, encontró que la opción del cannabis medicinal no sólo se asocia con una menor adicción, sino que también es significativamente más barato para el gobierno [67]. En esta misma línea un estudio de Asuntos de Salud que examinó los datos de la Parte D de Medicare de 2010 a 2013, hecho por los mismos autores, reportó que los costos de salud pública se pueden disminuir mediante la prescripción y el uso de cannabis medicinal.

Otro estudio que examinó datos del Archivo Analítico Estándar de Medicamentos Recetados de la Parte D de Medicare para 2010 a 2013 investigó más de ochenta y siete millones de observaciones de médicos-medicamentos por año [68]. En siete categorías donde los medicamentos recetados y el cannabis medicinal son opciones viables de tratamiento médico, se encontró una reducción significativa de los productos farmacéuticos recetados por los médicos. Las dosis diarias suministradas por los médicos para las siguientes categorías cayeron en los Estados con leyes sobre cannabis medicinal de la siguiente manera: Ansiedad (-562), Depresión (-265), Náuseas (-541), Dolor (-1,826), Psicosis (-519), Convulsiones (-486), Trastornos del sueño (-362), Espasticidad (-32), Glaucoma (+35). Esto cayó en todas las categorías en una cantidad estadísticamente significativa, excepto en Espasticidad y Glaucoma [69].

De 2010 a 2013, el cannabis medicinal ahorró a Medicare más de \$515 millones. Estos ahorros aumentaron cada año durante este estudio de cuatro años, alcanzando su punto máximo en 2013; solo los ahorros de costos de Medicare en 2013 excedieron los \$165 millones debido al cannabis medicinal. Los autores estiman que, si el cannabis medicinal se aprobara en todos los Estados, se generarían \$468,1 millones en ahorros anuales solo para la Parte D de Medicare, lo que representa aproximadamente una reducción del 0,5% en el total.

En un estudio similar, que examinó datos centrados en Medicaid (realizado utilizando la misma metodología por los mismos autores del estudio de la Parte D de Medicare), se encontró que el ahorro de costos del cannabis medicinal para Medicaid era aún mayor [67]. El ahorro de costos de las tarifas Medicaid por servicio en 2014, si todos los Estados hubieran legalizado

el cannabis medicinal, sería de \$1,01 mil millones, lo que representa aproximadamente el 2% del gasto total de pago por servicio de Medicaid [67].

Si bien el ahorro de costos anual estimado para el gobierno es ligeramente limitado, 0,5% anual para Medicare Parte D y 2% anual para Medicaid de pago por servicio, todavía representan un ahorro de costos estimado de poco menos de \$1,5 mil millones en conjunto por año [67].

De otro lado en el Reino Unido, la legalización del cannabis para uso médico ha supuesto un ahorro adicional para el presupuesto sanitario. Esto se debe a que en los estados donde se ha legalizado el cannabis ha habido una disminución en el número de recetas de analgésicos [67]. Esto ha sido corroborado por estudios adicionales [70]. Uno de esos estudios encontró que el resultado fue que el 34 por ciento de los pacientes dejaron de necesitar una receta para analgésicos que contienen opioides y un 36 por ciento adicional que reduce el número de recetas [71].

Un estudio adicional, encontró que los medicamentos opioides se redujeron en el 38 por ciento de los pacientes, las benzodiazepinas se redujeron en el tres por ciento de los pacientes y otros analgésicos se redujeron en un 22 por ciento de los pacientes [72].

Otro estudio reveló que el uso de cannabis medicinal condujo a una disminución del 37,6 por ciento en el uso de antidepresivos [73]. Esto es significativo ya que el NHS en Inglaterra recetó 64,7 millones de antidepresivos en 2016 a un costo de £266,6 millones [74]. La evidencia sugiere que el uso de cannabis medicinal hace que los pacientes con dolor crónico tengan menos probabilidades de deprimirse [75], por tanto la prescripción de cannabis medicinal para el dolor, utilizando una estimación conservadora de una disminución del 30 por ciento en las prescripciones de antidepresivos, podría generar ahorros de £79,98 millones cada año.

Con respecto al insomnio, en 2017, se emitieron más de 12 millones de recetas para el insomnio en el Reino Unido, con un coste para el NHS de £72 millones [76]. Por lo tanto, si los resultados del estudio estadounidense se replicaran en el Reino Unido, y tomando una cifra conservadora de 60 por ciento de reducción, la legalización del cannabis podría suponer un ahorro anual para el NHS de £43,2 millones.

La ansiedad también acompaña los pacientes con dolor crónico. El NHS gasta aproximadamente £30 millones cada año en medicamentos contra la ansiedad [77]. Suponiendo una reducción conservadora del 70 por ciento en el uso de medicamentos contra la ansiedad, la prescripción del cannabis podría ahorrarle al NHS £21 millones cada año sólo en Inglaterra.

Otro aspecto importante, de la prescripción de cannabis medicinal, está respaldado por un creciente conjunto de pruebas sugiere que el consumo de cannabis puede conducir a una reducción en el uso de medicamentos recetados. Un gran número de estudios observacionales a nivel individual sobre el cannabis medicinal en Canadá, Estados Unidos, Israel y otras jurisdicciones han encontrado evidencia que sugiere que el cannabis reduce el uso de opioides y otros medicamentos recetados, particularmente en pacientes afectados por dolor crónico [78, 79]. En esta misma línea una revisión sistemática del cannabis medicinal para la reducción de la dosis de opioides en el tratamiento del dolor no relacionado con el cáncer que incluyó a 7.222 participantes encontró que entre el 32% y el 59,3% informaron sustituir los opioides por cannabis, lo que resultó en una reducción del 64% al 75% en la dosis de opioides cuando se combinó con cannabis [80]. Un estudio más realizado en Canadá en el 2021 realizado por Lee *et al.* [81] encontró que la autorización de cannabis medicinal se asoció con una reducción semanal significativa del equivalente de morfina oral entre las personas que recibían dosis altas de opioides (es decir, equivalente de morfina oral >100) y sin embargo, entre las personas que recibieron dosis más bajas, se observó un aumento semanal. Estos hallazgos proporcionan

evidencia directa de la asociación entre la autorización de cannabis medicinal y los cambios en las dosis de opioides.

A manera de ejemplo en Colombia, la prescripción de analgésicos para el manejo del dolor, podría reducirse, pues los consumos son muy altos. Un trabajo realizado por Valladales-Restrepo *et al.* [82] sobre el patrón de prescripción de analgésicos en Colombia, analizando una base de datos de 8,5 millones de colombianos, identificó que a un total de 573.248 pacientes (67,6%, se les había prescrito algún analgésico. Se recetaron un total de 77 medicamentos diferentes; el 71,0% (n = 406.750) de los pacientes recibió una sola receta, mientras que el 29,0% (n = 166.498) recibió dos o más recetas. Los grupos de analgésicos más utilizados fueron los analgésicos no opioides, seguidos de los antiespasmódicos y los analgésicos opioides [82].

Otro ejemplo lo constituye el trabajo realizado por Toro *et al.* [83], un estudio de costo-efectividad publicado por la Asociación Colombiana para el Estudio del Dolor, en donde se compara el uso de pregabalina versus gabapentina y carbamazepina para el tratamiento de dolor neuropático en pacientes con polineuropatía diabética. La Pregabalina con una efectividad de 46% supera a las efectividades de gabapentin y carbamazepina en 6 puntos y 13 puntos porcentuales respectivamente. La razón costo-efectividad muestra que cada paciente que logre la medida de efectividad evaluada con pregabalina tiene un costo anual de \$8.701.708, lo cual es un 30% más económico comparado con gabapentin y 34% comparado con carbamazepina. El estudio fue realizado en 2008. Si a esto le incrementamos la inflación del 25%, el costo sería de \$10.877.135. En la actualidad si este paciente se tratara con cannabis medicinal en una ratio 27 mg/THC y 25 mg/CBD por ml, frasco de 30 ml al costo actual de \$260.000, el costo de un paciente sería de \$3.120.000, con un ahorro aproximado del 70%.

Un aspecto no menos importante, es que un número de personas beneficiarias del cannabis medicinal son los pacientes de la tercera edad generalmente polimedicados. Si bien en este grupo etario, la polifarmacia en personas mayores puede ser necesaria [84], pero también tiene posibles efectos negativos que incluyen una menor adherencia, eventos adversos a los medicamentos, una mayor utilización de la atención médica, caídas, deterioro cognitivo y mortalidad [85]. Al respecto Abuhasira *et al.* [86], en un estudio que involucro 2.736 pacientes mayores de 65 años tratados con cannabis medicinal para el dolor (66,6%) y el cáncer (60,8%) y polimedicados, 791 de los pacientes (87,8%) respondieron las preguntas sobre cambios en el régimen de medicación a los seis meses: 463 pacientes (58,5%) no reportaron cambios en el número total de medicamentos crónicos que utilizan y 104 (13,1%) iniciaron tratamiento con un nuevo medicamento, 278 pacientes (35,1%) informaron una disminución en el número de medicamentos o su dosis, y 47 pacientes (5,9%) informaron un aumento en el número de medicamentos o su dosis. Además, 143 pacientes (18,1%) dejaron de utilizar analgésicos opioides o redujeron su dosis, mientras que sólo 32 (4,0%) aumentaron la dosis de opioides o comenzaron a utilizarlos tras el inicio del tratamiento con cannabis. Los medicamentos usados por estos pacientes y los hallazgos del estudio pueden verse en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios en los regímenes de medicación de pacientes tratados con cannabis medicinal después de seis meses (n = 791)

Clase de fármaco	Número de pacientes que detuvieron el uso de un determinado fármaco	Número de pacientes que redujeron la dosis de un determinado fármaco	Número de pacientes que incrementaron la dosis de un determinado fármaco	Número de pacientes que adicionaron un nuevo fármaco
Analgésicos opiáceos ^a	114 (14,4%)	29 (3,7%)	6 (0,8%)	26 (3,3%)
Otros fármacos analgésicos ^b	58 (7,3%)	17 (2,1%)	0 (0,0 %)	6 (0,8%)
Benzodiazepinas	59 (7,5%)	14 (1,8%)	1 (0,1%)	5 (0,6%)
Fármacos para el dolor neuropático ^c	32 (4,0%)	14 (1,8%)	0 (0,0%)	6 (0,8%)
ISRS o IRSN ^d	17 (2,1%)	2 (0,3%)	2 (0,3%)	7 (0,9%)
Antihipertensivos	90 (11,4%)	13 (1,6%)	4 (0,5%)	9 (1,1%)
Antidiabéticos	23 (2,9%)	6 (0,8%)	0 (0,0%)	4 (0,5%)
Antipsicóticos	15 (1,9%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	9 (1,1%)
Antieméticos	15 (1,9%)	2 (0,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Otros fármacos	242 (30,6%)	36 (4,6%)	19 (2,4%)	76 (9,6%)
Total	665 (84,1%)	134 (16,9%)	32 (4,0%)	148 (18,7%)

^a Incluye: morfina, tramadol, fentanilo, oxicodona, buprenorfina, oxicodona-naloxona (Percocet®), codeína-cafeína-paracetamol (Rokacet®). ^b Incluye: AINEs, paracetamol, dipirona. ^c Incluye: pregabalina, gabapentina, amitriptilina.

^d ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina; IRSN: Inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina. Fuente: Modificado de Abuhasira *et al.* [86].

Finalmente, otra variable importante a considerar, es el mejoramiento en la calidad de vida de los pacientes y cuidadores cuando se prescribe cannabis medicinal. Al respecto, varios estudios han informado que los cannabinoides hacen un aporte importante en la calidad de vida [87, 88]. Entre los aspectos que se destacan, además de la mejora del dolor, están: menos efectos adversos en comparación con los producidos por los medicamentos convencionales (sedación, náuseas, estreñimiento, sequedad en la boca), mejora del apetito, sueño y estado de ánimo, aspectos todos estos que también redundan en el bienestar de los cuidadores.

4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, dan cuenta de las barreras de acceso de los pacientes en Colombia, con relación al cannabis medicinal. Aunque lo encontrado representa avances importantes que pueden facilitar la prescripción de preparados magistrales en ciertos pacientes y con ello aumentar la evidencia clínica de los resultados en salud, se requiere de más estrategias. Por ello, es clara la necesidad de acompañar la legislación que regula los componentes o materias primas (productos intermedios) con normas, estrategias y guías que favorezcan el desarrollo y utilización de productos finales, como lo han hecho países como Australia [89], Estados Unidos [90] y más reciente Brasil [91], con la estrategia de Registros Sanitarios Abreviados, en el contexto de productos a base de cannabis y no de medicamentos en el sentido estricto, lo que puede generar beneficios para el sistema de salud y los pacientes.

Se deben revisar y ajustar las políticas y estrategias para fortalecer el acceso real, al tratamiento con derivados cannábicos 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 ayudar a propiciar el debate y sentar bases para futuras investigaciones que se pueden integrar en políticas públicas, planes o proyectos que busquen mejorar el acceso a los tratamientos

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 con base en cannabis.

Es importante considerar que si el estado colombiano quiere propender por un desarrollo de industria farmacéutica nacional deberá visionar estrategias que faciliten el acceso y el costo beneficio de las terapias desarrolladas en el país y propender por cargas tributarias especiales que estimulen la creación de alternativas terapéuticas y no barreras que dificulten obtener productos farmacéuticos de competitividad mundial.

LIMITACIONES

Como limitación del estudio es de aclarar que se pudieron omitir referencias no detectadas en los procesos de selección y tamizaje. Igualmente debe mencionarse la procedencia de algunas de las referencias provenientes de páginas web de organismos gubernamentales y no gubernamentales, de empresas farmacéuticas cuyas publicaciones no han sido sometidas a evaluación por pares.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de interés

REFERENCIAS

1. P. Pacher, N.M. Kogan & R. Mechoulam. Beyond THC and endocannabinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 637–659 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441>
2. R.G. Pertwee. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.*, **156**(3), 397–411 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x>
3. A.R. de Mello-Schier, N.P. de Oliveira-Ribeiro, A.C. de Oliveira e Silva, J.E.C. Hallak, J.A.S. Crippa, A.E. Nardi & A.W. Zuardi. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an anxiolytic drug. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, **34**(Suppl 1), S104–S110 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1590/s1516-44462012000500008>
4. K.K. O'Connell, D. Gloss & O. Devinsky. Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy Behav.*, **70**, 341–348 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.012>
5. I. Dykukha, R. Malessa, U. Essner & M.A. Überall. Nabiximols in chronic neuropathic pain: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Pain Med.*, **22**(4), 861–874 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/pm/pnab050>
6. P.F. Whiting, R.F. Wolff, S. Deshpande, M. Di Nisio, S. Duffy, A.V. Hernandez, J.C. Keurentjes, S. Lang, K. Misso, S. Ryder, S. Schmidkofer, M. Westwood & J. Kleijnen. Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **313**(24), 2456–2473 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6358>. Erratum en: *JAMA*, **314**(5), 520 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.8253>. Erratum en: *JAMA*, **314**(8), 837 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.9010>. Erratum en: *JAMA*, **314**(21), 2308 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.15929>. Erratum en: *JAMA*, **315**(14), 1522 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.3470>

7. B.J. Piper, R.M. DeKeuster, M.L. Beals, C.M. Cobb, C.A. Burchman, L. Perkinson, S.T. Lynn, S.D. Nichols & A.T. Abess. Substitution of medical cannabis for pharmaceutical agents for pain, anxiety, and sleep. *J. Psychopharmacol.*, **31**(5), 569–575 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1177/0269881117699616>
8. J. Ryan & N. Sharts-Hopko. The experiences of medical marijuana patients: A scoping review of the qualitative literature. *J. Neurosci. Nurs.*, **49**(3), 185–190 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1097/jnn.0000000000000283>
9. A. Hulaihel, O. Gliksberg, D. Feingold, S. Brill, B.H. Amit, S. Lev-Ran & S.R. Sznitman. Medical cannabis and stigma: A qualitative study with patients living with chronic pain. *J. Clin. Nurs.*, **32**(7-8), 1103–1114 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1111/jocn.16340>
10. A.K. Schlag, R. Zafar & D. Nutt. Medical cannabis and epilepsy in the UK – A qualitative analysis of the carers’ perspective: “We’re asking for quality of life for our children”. *Drug Sci. Policy Law*, **7**, 1–10 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1177/20503245211034930>
11. K.M. Gardiner, J.A. Singleton, J. Sheridan, G.J. Kyle & L.M. Nissen. Beliefs, knowledge and concerns of health professionals regarding medicinal cannabis: a systematic review. *PLoS One*, **14**(5), e0216556 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216556>
12. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 811 de 2021 (“Por el cual se sustituye el Título 11 de la Parte 8 del Libro 2 del Decreto 780 de 2016, Único Reglamentario del Sector Salud y Protección Social, en relación con el acceso seguro e informado al uso del cannabis y de la planta de cannabis”). Bogotá D. C., Colombia, 2021; 59 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/decreto-811-de-2021.pdf>. Consultado el 4 de marzo de 2024.
13. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 315 de 2020 (“Por la cual se actualizan los listados de estupefacientes, psicotrópicos, precursores y demás sustancias sometidas a fiscalización, de aquellas clasificadas como monopolio del Estado y de los medicamentos de control especial de uso humano y veterinario, y se dictan otras disposiciones”). Bogotá D. C., Colombia, 2020; 37 p. URL: https://minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%200315%20de%202020.pdf. Consultado el 4 de marzo de 2024.
14. INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. *Guía para las visitas de buenas prácticas de elaboración de preparaciones magistrales a base de cannabis*. Bogotá D. C., Colombia, 2020. URL: <https://www.invima.gov.co/productos-vigilados/medicamentos-y-productos-biologicos/cannabis-medicinal>. Consultado el 4 de marzo de 2024.
15. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2808 de 2022 (“Por la cual se establecen los servicios y tecnologías de salud financiados con recursos de la Unidad de Pago por Capitación (UPC)”). Bogotá D. C., Colombia, 2022; 132 p. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%202808%20de%202022.pdf. Consultado el 4 de marzo de 2024.
16. Corte Constitucional. Sentencia T-451, Bogotá D. C., Colombia. URL: <https://www.corteconstitucional.gov.co/relatoria/2023/T-451-23.htm>. Consultado el 4 de marzo de 2024.
17. A.B. Evanoff, T. Quan, C. Dufault, M. Awad & L.J. Bierut. Physicians-in-training are not prepared to prescribe medical marijuana. *Drug Alcohol Depend.*, **180**, 151–155 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.08.010>
18. L. Belle-Isle, Z. Walsh, R. Callaway, P. Lucas, R. Capler, R. Kay & S. Holtzman. Barriers to access for Canadians who use cannabis for therapeutic purposes. *Int. J. Drug Policy*, **25**, 691–699 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2014.02.009>
19. J. Hwang, T. Arneson & W. St Peter. Minnesota pharmacists and medical Cannabis: A survey of knowledge, concerns, and interest prior to program launch. *P T.*, **41**(11), 716–722 (2016).
20. K.E. Moeller & B. Woods. Pharmacy students’ knowledge and attitudes regarding medical marijuana. *Am. J. Pharm. Educ.*, **79**(6), 85 (2015). Doi: <https://doi.org/10.5688/ajpe79685>
21. B. Carlini, G. Carter, R. Roffman & R.N. Takahashi. *Medical cannabis and chronic pain*. Science-based education in times of legalization. University of Washington Institute on Drug and Alcohol Abuse, 2017. URL: <https://ada.uw.edu/cerp/mcacp/>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.

-
22. Federación Médica Colombiana. *Formación médica para una óptima prescripción de cannabis medicinal*. Bogotá D. C., Colombia, 2023. URL: <https://www.federacionmedicacolombiana.com/2023/04/12/formacion-medica-para-una-optima-prescripcion-de-cannabis-medicinal/>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 23. C. Lopera-Londoño, D. Pino-Marín, M. Ceballos & P. Amariles. Percepción de los estudiantes de los programas de Química farmacéutica, tecnología en regencia de farmacia y medicina de la Universidad de Antioquia frente al uso terapéutico de los cannabinoides. *Salud UIS*, **50**(3), 215–223 (2018). Doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v50n3-2018006>
 24. ProColombia. *Industria del Cannabis en Colombia, 2018*. Bogotá D. C., Colombia, 2018. URL: <https://procolombia.co/publicaciones/industria-del-cannabis-2018-en-colombia>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 25. Redacción Semana. *Cannabis: el año de la verdad*. Revista Semana, Bogotá D. c., Colombia, 2020. URL: <https://www.semana.com/economia/articulo/cannabis-el-ano-de-la-verdad/648385>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 26. P. Zuleta, B. Tocua & T. Martínez-Ferro. *Cannabis Legal: desafíos de la industria de cannabis para usos médicos y científicos en Colombia*, CESED – Centro de Estudios sobre Seguridad y Drogas, Universidad de los Andes, Bogotá D. C., Colombia, 2023; 37 p. Disponible en https://cesed.unian-des.edu.co/wp-content/uploads/2023/12/Cannabisentrega3_DIAGRAMADO-1.pdf. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 27. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. *ABECÉ sobre el uso médico y científico del cannabis en Colombia: Decreto 613 del 10 de abril de 2017*. Bogotá D. C., Colombia, 2017; 5 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/COM/abece-cana-bis-colombia.pdf>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 28. Congreso de la República de Colombia. Ley 1819 de 2016 (“Por medio de la cual se adopta una reforma tributaria estructural, se fortalecen los mecanismos para la lucha contra la evasión y la elusión fiscal, y se dictan otras disposiciones.”). Bogotá D. C., Colombia, 2016. URL: <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=79140>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 29. Congreso de la República de Colombia. Ley 1787 de 2016 (“Por medio de la cual se reglamenta el Acto Legislativo 02 de 2009.”). Bogotá D. C., Colombia, 2016. URL: <https://www.funcionpu-blica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=80394>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 30. M.A. Ware, T. Wang, S. Shapiro & J.P. Collet, COMPASS study team. Cannabis for the Management of Pain: Assessment of Safety Study (COMPASS). *J. Pain*, **16**(12), 1233–1242 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.07.014>
 31. G.M. Allan, J. Ramji, D. Perry, J. Ton, N.P. Beahm, N. Crisp, B. Dockrill, R.E. Dubin, T. Findlay, J. Kirkwood, *et al.* Simplified guideline for prescribing medical cannabinoids in primary care. *Can. Fam. Physician*, **64**(2), 111–120 (2022). URL: <https://www.cfp.ca/content/cfp/64/2/111.full.pdf>
 32. College of Physicians and Surgeons of Alberta. *Cannabis for Medical Purposes: Standard of Practice*. URL: <https://cpsa.ca/physicians/standards-of-practice/cannabis-for-medical-purposes/>. Consultado el 27 de mayo de 2022.
 33. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*. National Academies Press (US), Washington DC, 2017. Doi: <https://doi.org/10.17226/24625> . Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 34. Queensland Health, *Clinical Guidance: for the use of medicinal cannabis products in Queensland*, Queensland Government, 2017; 32 p. URL: <https://www.parliament.qld.gov.au/Work-of-the-Assembly/Tabled-Papers/docs/5517t966/5517t966.pdf>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 35. Ministry of Health, Welfare and Sports. Office of Medicinal Cannabis. Information for pharmacists and healthcare professionals (Version November 2021), The Hague, The Netherlands, 2021; 6 p. URL: <https://english.cannabisbureau.nl/documents/circulars/2018/07/03/information-for-pharma-cists-and-healthcare-professionals>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 36. A.D. Bell, C. MacCallum, S. Margolese, Z. Walsh, P. Wright, P.J. Daeninck, E. Mandarino, G. Lacasse, J.K. Deol, L. Freitas, *et al.* Clinical practice guidelines for cannabis and cannabinoid based
-

-
- medicines in the management of chronic pain and cooccurring conditions. *Cannabis and Cannabinoid Research*, **9**(2), 669–687 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1089/can.2021.0156>
37. Minnesota Department of Health. *Health Care Practitioner Guidance for Minnesota's Medical Cannabis Program*, 2023; 6 p. URL: https://mn.gov/ocm/assets/Health%20Care%20Practitioner%20Guidance%20for%20MN%27s%20Medical%20Cannabis%20Program_tcm1202-628222.pdf. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 38. Medical Cannabis Clinicians Society. *Recommendations and Guidance on Medical Cannabis under Prescription*, 2nd. ed. London, UK, 2020; 11 p. URL: <https://www.ukmccs.org/wp-content/uploads/2020/03/Recommendations-and-Guidance-on-Medical-Cannabis-under-Prescription-2nd-Edition-2020.pdf>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 39. National Institute for Health and Care Excellence (NICE Guideline). *Cannabis-based medicinal products*. London, UK, 2021, 30 p. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng144/resources/cannabisbased-medicinal-products-pdf-66141779817157>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 40. Israel Ministry of Health, The Medical Cannabis Unit. *IMC-GCP Cannabis for medical use: Information booklet and medical guide*. Circular number 154/2016. Jerusalem, Israel, 2019. URL: <https://www.gov.il/en/pages/about-yakar>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 41. Utah Department of Health and Human Services. *Guidance on the suggested use of medical cannabis*. 2022; 56 p. URL: https://medicalcannabis.utah.gov/wp-content/uploads/Guidance-on-the-Suggested-Use-of-Medical-Cannabis_v1_Final-1.pdf. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 42. República de Colombia, Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud. *Documento técnico para el desarrollo de una Revisión Sistemática de Literatura de Efectividad y Seguridad de grupo para aplicaciones médicas de cannabis y productos terminados derivados del cannabis*. Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá D. C., Colombia, 2022; 168 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VP/RBC/rsl-efectividad-seguridad-aplicaciones-medicas-cannabis-productos-terminados-cannabis.pdf>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 43. D.I. Abrams, J.F. Hilton, R.J. Leiser, S.B. Shade, T.A. Elbeik, F.T. Aweeka, N.L. Benowitz, B.M. Bredt, B. Kosel, J.A. Aberg, *et al.* Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-1 infection: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.*, **139**(4), 258–266 (2003). Doi: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-4-200308190-00008>
 44. A. Andries, J. Frystyk, A. Flyvbjerg & R.K. Støving. Dronabinol in severe, enduring anorexia nervosa: a randomized controlled trial. *Int. J. Eat. Disord.*, **47**(1), 18–23 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1002/eat.22173>
 45. M. Haney, J. Rabkin, E. Gunderson & R.W. Foltin. Dronabinol and marijuana in HIV+ marijuana smokers: Acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology*, **181**(1), 170–178 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2242-2>
 46. M. Haney, E.W. Gunderson, J. Rabkin, C.L. Hart, S.K. Vosburg, S.D. Comer & R.W. Foltin. Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers. Caloric intake, mood, and sleep. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **45**(5), 545–554 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1097/qai.0b013e31811ed205>
 47. J.G. Timpone, D.J. Wright, N. Li, M.J. Egorin, M.E. Enama, J. Mayers & G. Galetto. The safety and pharmacokinetics of single-agent and combination therapy with megestrol acetate and dronabinol for the treatment of HIV wasting syndrome. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **13**(4), 305–315 (1997). Doi: <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.305>
 48. E. Meiri, H. Jhangiani, J.J. Vredenburgh, L.M. Barbato, F.J. Carter, H.M. Yang & V. Baranowski. Efficacy of dronabinol alone and in combination with ondansetron versus ondansetron alone for delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Curr. Med. Res. Opin.*, **23**(3), 533–543 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1185/030079907x167525>
 49. A.H. Söderpalm, A. Schuster & H. de Wit. Antiemetic efficacy of smoked marijuana: Subjective and behavioral effects on nausea induced by syrup of ipecac. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69**(3–4), 343–350 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00533-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00533-0)
 50. D.R. Blake, P. Robson, M. Ho, R.W. Jubb & C.S. McCabe. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by
-

-
- rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford), **45**(1), 50–52 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei183>
51. J.R. Johnson, M. Burnell-Nugent, D. Lossignol, E.D. Ganae-Motan, R. Potts & M.T. Fallon. Multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. *J. Pain Symptom. Manage.*, **39**(2), 167–179 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.06.008>
 52. R.Q. Skrabek, L. Galimova, K. Ethans & D. Perry. Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. *J. Pain*, **9**(2), 164–173 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.09.002>
 53. R.M. Langford, J. Mares, A. Novotna, M. Vachova, I. Novakova, W. Notcutt & S. Ratcliffe. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol.*, **260**(4), 984–997 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6739-4>
 54. D. Turcotte, M. Doupe, M. Torabi, A. Gomori, K. Ethans, F. Esfahani, K. Galloway & M. Namaka. Nabilone as an adjunctive to gabapentin for multiple sclerosis-induced neuropathic pain: a randomized controlled trial. *Pain Med.*, **16**(1), 149–159 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1111/pme.12569>
 55. M.S. Wallace, T.D. Marcotte, A. Umlauf, B. Gouaux & J.H. Atkinson. Efficacy of inhaled Cannabis on painful diabetic neuropathy. *J. Pain*, **16**(7), 616–627 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.03.008>
 56. S. Pooyania, K. Ethans, T. Szturm, A. Casey & D. Perry. A randomized, double-blinded, crossover pilot study assessing the effect of nabilone on spasticity in persons with spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **91**(5), 703–707 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2009.12.025>
 57. O. Devinsky, J.H. Cross, L. Laux, E. Marsh, I. Miller, R. Nabbut, I.E. Scheffer, E.A. Thiele & S. Wright; Cannabidiol in Dravet Syndrome Study Group. Trial of Cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **376**(21), 2011–2020 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1611618>
 58. E.A. Thiele, E.D. Marsh, J.A. French, M. Mazurkiewicz-Beldzinska, S.R. Benbadis, C. Joshi, P.D. Lyons, A. Taylor, C. Roberts & K. Sommerville; GWPCARE4 Study Group. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, **391**(10125), 1085–1096 (2018). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30136-3)
 59. K. Vyas. The power of real-world evidence in rare and difficult-to-treat epilepsies. Jazz Pharmaceuticals, Inc., 2018. URL: <https://www.jazzpharma.com/perspectives/power-real-world-evidence-rare-and-difficult-treat-epilepsies>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
 60. R. Jetly, A. Heber, G. Fraser & D. Boisvert. The efficacy of nabilone, a synthetic cannabinoid, in the treatment of PTSD-associated nightmares: A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over design study. *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 585–588 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.11.002>
 61. K.R. Müller-Vahl, U. Schneider, A. Koblenz, M. Jöbges, H. Kolbe, T. Daldrup & H.M. Emrich. Treatment of Tourette's syndrome with Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC): a randomized crossover trial. *Pharmacopsychiatry*, **35**(2), 57–61 (2002). Doi: <https://doi.org/10.1055/s-2002-25028>
 62. P. Fox, P.G. Bain, S. Glickman, C. Carroll & J. Zajicek. The effect of cannabis on tremor in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, **62**(7), 1105–1109 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000118203.67138.3e>
 63. H.S. Greenberg, S.A. Werness, J.E. Pugh, R.O. Andrus, D.J. Anderson & E.F. Domino. Short-term effects of smoking marijuana on balance in patients with multiple sclerosis and normal volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**(3), 324–328 (1994). Doi: <https://doi.org/10.1038/clpt.1994.33>
 64. Z.D.S. Vicente-Célis, J.C. Salazar, R. Pineda-Tamayo & J.M. Anaya. Sobre la necesidad de la farmacoeconomía. Comenzar por los principios. *Rev. Colomb. Reumatol.*, **18**(3), 187–202 (2011). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0121-8123\(11\)70053-6](https://doi.org/10.1016/S0121-8123(11)70053-6)
 65. J.M. Corroon, Jr., L.K. Mischley & M. Sexton. Cannabis as a substitute for prescription drugs - a cross-sectional study. *J. Pain Res.*, **10**, 989–998 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2147/jpr.s134330>
-

66. D.J. Kruger & J.S. Kruger. Medical cannabis users' comparisons between medical cannabis and mainstream medicine. *J. Psychoactive Drugs*, **51**(1), 31–36 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1080/02791072.2018.1563314>
67. A.C. Bradford & W.D. Bradford. Medical marijuana laws reduce prescription medication use in Medicare Part D. *Health Affairs* (Millwood), **35**(7), 1230–1236 (2016). doi: <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2015.1661>
68. Parts of Medicare. U.S. Centers for Medicare and Medicaid Services. Baltimore, MD. URL: <https://www.medicare.gov/what-medicare-covers/your-medicare-coverage-choices/whats-medicare>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
69. N. Ecker. The right prescription: High cost savings and other benefits from Medicare and Medicaid coverage of medical marijuana (April 14, 2022). Ohio State Legal Studies Research Paper No. 699, Drug Enforcement and Policy Center, No. 49, April 2022. Doi: <http://doi.org/10.2139/ssrn.4084028>
70. J.M. Corroon, Jr., L.K. Mischley & M. Sexton. Cannabis as a substitute for prescription drugs - a cross-sectional study. *J. Pain Res.*, **10**, 989–998 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2147/jpr.s134330>
71. S.S. Stith, J.M. Vigil, I.M. Adams & A.P. Reeve. Effects of legal access to cannabis on Scheduled II-V drug prescriptions. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, **19**(1), 59–64.e1 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2017.07.017>
72. Minnesota Department of Health. Intractable pain patients in the Minnesota Medical Cannabis Program: Experience of enrollees during the first five months, 2018. URL: <https://mn.gov/ocm/dmc/data-reports/special-reports/intractable-pain.jsp>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
73. B.J. Piper, R.M. DeKeuster, M.L. Beals, C.M. Cobb, C.A. Burchman, L. Perkinson, S.T. Lynn, S.D. Nichols & A.T. Abess. Substitution of medical cannabis for pharmaceutical agents for pain, anxiety, and sleep. *J. Psychopharmacol.*, **31**(5), 569–575 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1177/0269881117699616>
74. NHS Digital, Antidepressants were the area with largest increase in prescription items in 2016. London, UK, June 2017. URL: <https://www.wired-gov.net/wg/news.nsf/articles/Antidepressants%20were%20the%20area%20with%20largest%20increase%20in%20prescription%20items%20in%202016%2030062017111500>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
75. D. Feingold, S. Brill, I. Goor-Aryeh, Y. Delayahu & S. Lev-Ran. Depression and anxiety among chronic pain patients receiving prescription opioids and medical marijuana. *J. Affect. Disord.*, **218**, 1–7 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.04.026>
76. NHS Innovation Accelerator. *NHS in Thames Valley to tackle sleeping pills epidemic with digital medicine*. London, UK, March 2018. URL: <https://nhsaccelerator.com/news-item/nhs-thames-valley-tackle-sleeping-pills-epidemic-digital-medicine/>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
77. P. McCrone, S. Dhanasiri, A. Patel, M. Knapp & S. Lawton-Smith. *Paying the price: The cost of mental health care in England to 2026*. King's Fund, London, UK, 2008. URL: <https://www.kings-fund.org.uk/insight-and-analysis/reports/paying-price-mental-health-cost>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
78. K.F. Boehnke, J.R. Scott, E. Litinas, S. Sisley, D.A. Williams & D.J. Clauw. Pills to pot: Observational analyses of cannabis substitution among medical cannabis users with chronic pain. *J. Pain*, **20**(7), 830–841 (2019). doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.01.010>
79. H. Wen & J.M. Hockenberry. Association of medical and adult-use marijuana laws with opioid prescribing for Medicaid enrollees. *JAMA Intern. Med.*, **178**(5), 673–679 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.1007>
80. B. Okusanya, I.O. Asaolu, J.E. Ehiri, L.J. Kimaru, A. Okechukwu & C. Rosales. Medical cannabis for the reduction of opioid dosage in the treatment of non-cancer chronic pain: a systematic review. *Syst. Rev.*, **9**(1), 167 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01425-3>
81. C. Lee, M. Lin, K.J.B. Martins, J.R.B. Dyck, S. Klarenbach, L. Richer, E. Jess, J.G. Hanlon, E. Hyshka & D.T. Eurich. Opioid use in medical cannabis authorization adult patients from 2013 to 2018: Alberta, Canada. *BMC Public Health*, **21**(1), 843 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10867-w>

-
82. L.F. Valladales-Restrepo, S. Rubio-Londoño, L.F. Poveda-Martínez & J.E. Machado-Alba. Prescribing pattern of analgesics in Colombia. Are there differences between capital cities and municipalities? A cross-sectional study. *Drugs – Real World Outcomes*, **9**(3), 487–501 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/s40801-022-00318-2>
83. W. Toro, A. Wagib, C. Arango, E. Valenzuela, M. Quijano, H. Cacerez & S. Gómez. Análisis de costo-efectividad de pregabalina versus gabapentin y carbamazepina en el tratamiento de dolor neuropático en pacientes con polineuropatía diabética en Colombia. *Revista Oficial de la Asociación Colombiana para el Estudio del Dolor*, **3**(1), 58–67 (2008). URL: <https://dolor.org.co/biblioteca/revistas/REVISTA%203-1.pdf>
84. M. Duerden, T. Avery & R. Payne. *Polypharmacy and medicines optimization: Making it safe and sound*. The King's Fund, London, 2013. URL: <https://www.kingsfund.org.uk/insight-and-analysis/reports/polypharmacy-and-medicines-optimisation>. Consultado el 8 de septiembre de 2024.
85. R.L. Maher, J. Hanlon & E.R. Hajjar. Clinical consequences of polypharmacy in elderly. *Expert Opinion on Drug Safety*, **13**(1), 57–65 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.827660>
86. R. Abuhaira, L.B. Schleider, R. Mechoulam & V. Novack. Epidemiological characteristics, safety and efficacy of medical cannabis in the elderly. *Eur. J. Intern. Med.*, **49**, 44–50 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.019>
87. M.-A. Fitzcharles, C. Baerwald, J. Ablin & W. Häuser. Efficacy, tolerability and safety of cannabinoids in chronic pain associated with rheumatic diseases (fibromyalgia syndrome, back pain, osteoarthritis, rheumatoid arthritis): A systematic review of randomized controlled trials. *Schmerz*, **30**(1), 47–61 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00482-015-0084-3>
88. W. Häuser, F. Petzke & M.A. Fitzcharles. Efficacy, tolerability and safety of cannabis-based medicines for chronic pain management - An overview of systematic reviews. *Eur. J. Pain*, **22**(3), 455–470 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1002/ejp.1118>
89. Australian Government, Department of Health and Aged Care. *Guidance for the use of medicinal cannabis for the prevention or management of nausea and vomiting in Australia*. Canberra, 2017. URL: <https://www.tga.gov.au/resources/resource/reference-material/guidance-use-medicinal-cannabis-prevention-or-management-nausea-and-vomiting-australia>. Consultado el 4 de marzo de 2024.
90. P. Makary, J.R. Parmar, N. Mims, N.M. Khanfar & R.A. Freeman. Patient Counseling Guidelines for the use of cannabis for the treatment of chemotherapy-induced nausea/vomiting and chronic pain. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.*, **32**(4), 216–225 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1080/15360288.2019.1598531>
91. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução da diretoria colegiada - RDC No 327, de 9 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. Brasília, 2019. URL: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0327_09_12_2019.pdf. Consultado el 8 de septiembre de 2024.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

G.A. Castaño, S. Carrillo & R. Malagón. Barreras de acceso al cannabis medicinal en Colombia. Una revisión narrativa. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 44–67 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119551>

Development and quality assessment of plantain flower [*Musa balbisiana* Colla] cookies: Beneficial for perimenopausal women

Shanthini Priya Prakash^a & Silambu Selvi Kumbamoorthy^{b*}

Clinical Nutrition and Dietetics Department, SRM Medical College Hospital and Research Centre, SRMIST, Kattankulathur, Chennai, India

E-mail addresses: ^a sp7757@srmist.edu.in, ^b silambuk1@srmist.edu.in

*Corresponding author

Received: September 9, 2024

Corrected: November 4, 2024

Accepted: November 12, 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116324>

SUMMARY

Background: *Musa balbisiana* Colla (Plantain flower) comprising of significant nutrients likely vitamins, minerals and phytochemical substituents such as flavonoids. The nutrients present in the plantain flower possess numerous therapeutic beneficiaries. The phytoestrogens commonly known as flavonoids act against the deficiency of estrogen and aid in achieving the quality health status of women. Although there are surplus quantity of plantain flowers in India, it is not used by several people in the nation. **Aim:** The present research aims to develop and evaluate the nutritional composition and shelf life of Plantain Flower (*Musa balbisiana* Colla) cookies. **Methods:** The plantain flower acquired from the farm has been processed as well as powdered. The cookies were prepared by utilizing plantain flower powder at the differential concentrations of 10%, 20%, and 30%. It is standardized by mixing with powdered sugar, jaggery, and butter. The sensory analysis of Plantain flower cookies was performed by 25 semi-trained panel members using a 9-point hedonic scale and the best-accepted product was nutritionally evaluated. **Results:** The study found that plantain flower cookies with 20% variation showed excellent overall acceptability compared to cookies with 10% and 30% variations. The cookies also had high nutritional content, with energy, carbohydrates, fat, protein, dietary fiber, sodium, potassium, calcium, magnesium, iron, and flavonoids. **Conclusion:** The nutritionally enriched plantain flower possessing surplus health beneficiaries will be utilized by incorporating them in the diverse nutritional food preparations for perimenopausal women.

Keywords: Plantain flower; cookies; therapeutic; shelf life; nutritional composition.

RESUMEN

Desarrollo y evaluación de la calidad de las galletas de flor de plátano [*Musa balbisiana* Colla]: beneficiosas para las mujeres perimenopáusicas

Antecedentes: *Musa balbisiana* Colla (flor de plátano) contiene nutrientes importantes, como vitaminas, minerales y sustituyentes fitoquímicos como los flavonoides. Los nutrientes presentes en la flor de plátano poseen numerosos beneficios terapéuticos. Los fitoestrógenos, comúnmente conocidos como flavonoides, actúan contra la deficiencia de estrógeno y ayudan a lograr un estado de salud de calidad en las mujeres. Aunque hay una cantidad excedente de flores de plátano en la India, varias personas en el país

no las utilizan. **Objetivo:** La presente investigación tiene como objetivo desarrollar y evaluar la composición nutricional y la vida útil de las galletas de flor de plátano (*Musa balbisiana* Colla). **Métodos:** La flor de plátano adquirida en la granja ha sido procesada y pulverizada. Las galletas se prepararon utilizando polvo de flor de plátano en concentraciones diferenciales de 10%, 20% y 30%. Se estandariza mezclándola con azúcar en polvo, jaggery y mantequilla. El análisis sensorial de las galletas de flor de plátano fue realizado por 25 miembros del panel semi-entrenados utilizando una escala hedónica de 9 puntos y el producto mejor aceptado fue evaluado nutricionalmente. **Resultados:** El estudio encontró que las galletas de flor de plátano con 20% de variación mostraron una excelente aceptabilidad general en comparación con las galletas con variaciones de 10% y 30%. Las galletas también tenían un alto contenido nutricional, con energía, carbohidratos, grasas, proteínas, fibra dietética, sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y flavonoides. **Conclusión:** La flor de plátano enriquecida nutricionalmente que posee beneficios excedentes para la salud se utilizará incorporándola en las diversas preparaciones alimenticias nutricionales para mujeres perimenopáusicas.

Palabras clave: Flor de plátano; galletas; terapéutico; vida útil; composición nutricional.

RESUMO

Desenvolvimento e avaliação da qualidade de biscoitos de flor de bananeira [*Musa balbisiana* Colla]: benéficos para mulheres na perimenopausa

Contexto: *Musa balbisiana* Colla (flor de bananeira) composta de nutrientes significativos, como vitaminas, minerais e substituintes fitoquímicos, como flavonoides. Os nutrientes presentes na flor de bananeira possuem inúmeros beneficiários terapêuticos. Os fitoestrogênios comumente conhecidos como flavonoides atuam contra a deficiência de estrogênio e auxiliam na obtenção do estado de saúde de qualidade das mulheres. Embora haja uma quantidade excedente de flores de bananeira na Índia, elas não são usadas por várias pessoas no país. **Objetivo:** A presente pesquisa visa desenvolver e avaliar a composição nutricional e o prazo de validade dos biscoitos de flor de bananeira (*Musa balbisiana* Colla). **Métodos:** A flor de bananeira adquirida na fazenda foi processada e também pulverizada. Os biscoitos foram preparados utilizando pó de flor de bananeira nas concentrações diferenciais de 10%, 20% e 30%. É padronizado pela mistura com açúcar de confeitaria, açúcar mascavo e manteiga. A análise sensorial dos biscoitos de flor de bananeira foi realizada por 25 membros do painel semi-treinados usando uma escala hedônica de 9 pontos e o produto mais bem aceito foi avaliado nutricionalmente. **Resultados:** O estudo descobriu que os biscoitos de flor de bananeira com 20% de variação apresentaram excelente aceitabilidade geral em comparação aos biscoitos com variações de 10% e 30%. Os biscoitos também tinham alto conteúdo nutricional, com energia, carboidratos, gordura, proteína, fibra alimentar, sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro e flavonoides. **Conclusão:** A flor de bananeira nutricionalmente enriquecida que possui benefícios excedentes à saúde será utilizada incorporando-os nas diversas preparações alimentares nutricionais para mulheres na perimenopausa.

Palavras-chave: Flor de bananeira; biscoitos; terapêutico; prazo de validade; composição nutricional.

1. INTRODUCTION

In the current world, the demand for nutritionally superior food has been increasing [1]. Also, the current trend emphasizes on the intake of nutritionally rich food products which are deduced from both leafy and non-leafy vegetables [2, 3]. The plantain flower (*Musa balbisiana* Colla Blossom) is the by-product of banana cultivation [4, 5]. The largest producer of bananas is India which produces around 13.90 million tons [6]. In India, the cultivation of bananas is

predicted to attain 35.5 million tons in 2029 and the cultivation in Asia is forecasted to reach 51.8% [7, 8].

Tamil Nadu ranks first in the production of banana cultivation in India and produced 118.04 hectares of crops in 2014 [9]. Moreover, Tamil Nadu alone produced 220 tons of banana blossoms in India [10]. The Banana blossom also known as the “banana flower” or “banana heart” can be eaten in raw or cooked form [11, 12]. Besides, the plantain flower is highly consumed in other Asian countries like Sri Lanka, Malaysia, Philippines, and Indonesia [13]. Compared to other countries, the cultivation and consumption of plantain flowers in Asian countries are higher due to their rich nutrients and anti-oxidants [14, 15].

The highest consumption of plantain flowers is due to their high protein, vitamin C, phytochemicals, mineral, and polyphenol content. Moreover, it is considered to have bioactive compounds such as flavonoids, saponins, polyphenols, phenols, triterpenes, tannins and diterpenes. The phytochemicals in the plantain flower act as antioxidants [16]. The anti-oxidant properties in *Musa balbisiana* Colla aid in preventing oxidative stress [17]. Plantain flower’s inflorescence contains cytotoxic characteristics and anti-oxidant activity [18]. The below Table-1 illustrates the Nutritional facts of Plantain Flowers per 100 g.

Table 1. Nutritional Analysis

Nutrients	Quantity (per 100 g)
Energy	51 kcal
Carbohydrate	8.79 g
Protein	1.63 g
Fat	0.50 g
Fiber	5.7 g
Beta-carotene	0.19 mg
Calcium	105 mg
Phosphorous	76 mg
Iron	3.5 mg
Copper	13 mg
Potassium	176 mg
Magnesium	56 mg
Flavonoids	137 mg

Banana blossoms are also high in phytochemical constituents, antioxidant properties, and medicinal benefits, making them a potential functional food with a huge amount of nutraceutical values that are essential for maintaining good health [19]. Some of the researchers have identified various phenolic acids in plantain blossom such as protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic, gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, catechol, gentistic acid, vanillin acid, and chlorogenic acid. Especially, some of the flavonoids such as epicatechin, rutin, catechin and quercetin have also been identified in the prevailing studies [20]. Plantain flower powder has enhanced the white blood cells as well as neutrophils that don’t affect the blood biochemistry as well as the enzyme-related liver function. Also, immune-related genes such as IL-10, HSP70, and TNF- α have been identified. The *Musa balbisiana* Colla powder with increased anti-oxidant enzyme activities has a significant effect on the liver tissue [21].

As per the nutritional composition of plantain flower, it has a significant source of protein, micronutrients and carbohydrates. This is utilized in the treatment of breast cancer, diabetics, the menstrual cycle, infection treatment, healing wounds, inflammatory bowel disease, and

inhibits AGE formation. Also, the consumption of plantain flowers on daily basis increases the hemoglobin level due to the presence of high fiber and iron. It aids in the production of red blood cells which reduces menstrual bleeding. Moreover, it regulates progesterone hormone and mitigates muscle cramps (Kavya M H et al., 2023) *Musa balbisiana* Colla has a great amount of phytochemicals for the food additive application, pharmacological and nutraceuticals [22]. This helps in reducing the post-prandial hyperglycemia which is considered as anti-diabetic agent [23]. It has rich fiber content which mitigates blood cholesterol and cardiovascular disease. Moreover, it has been utilized for treating constipation, bronchitis and ulcer [24]. It aids in increasing the red blood cells and promoting tissue repair [3].

Omar *et al.* [25] have established the nutritional value of the plantain flower powder. The research determined the radical scavenging activity of the plantain flower extract. As per the analysis, 500 mcg/mL of plantain flower extract has 56.66% antioxidant activity in the third trial. Thus, the researcher has highlighted the usage of plantain flowers as an anti-oxidant [25]. Sitthiya *et al.* [26] have identified the existence of tyrosine and tryptophan amino acid and also various peptides [26]. Moreover, Lau *et al.* [20] have highlighted that *Musa balbisiana* Colla has a significant amount of unsaturated fatty acids like linoleic, α -linolenic and oleic acids which mitigate the peril of cardiovascular disease [20]. Begum and Deka [16] have highlighted the concentration of plantain flower- 61.13-66.22 g/100 g (Total Dietary Fiber), 53.9-61.86 g/100 g (Insoluble Dietary Fiber) and 4.36-7.23 g/100 g (Soluble Dietary Fiber) [16].

In bakery products, cookies are one of the varieties which comprise various ingredients with sufficient fiber, vitamin C and protein [27]. Since cookies have a good shelf-life compared to other bakery products, various other research has developed cookies with black cumin seed, flax seed and sesame seed and evaluated their nutritional benefits [28]. Since baked food products are regarded as one of the significant foods in dietary plans, various nutritional ingredients have been incorporated to create the cookies [29]. Various studies have developed nutritional cookies using various nutritional food products [30, 31]. The cookies have been developed with ingredient which has the highest source of anti-oxidants, physicochemical properties, bio-active compounds, phenolic compounds and dietary fiber content in the food products [32, 33].

Bansal *et al.* [34] developed nutrient-dense cookies which has been enriched with micro-nutrients [34]. The researcher developed four types of cookies which consist of the control group, type1, type2 and type3. Control group does not have carrot and sesame powder whereas type1, type2 and type3 has 20%, 30% and 40% of carrot powder accordingly and 20% of sesame. The developed cookies have certain nutritional parameters such as protein, crude fat, fiber, and ash. Also, it has calcium, zinc and iron [35]. Hence, it depicted that cookies with carrot powder and sesame could be used to restrain malnutrition. Soares *et al.* [36] have developed cookies using wheat flour through cocoa bean shells which have higher bio-active compounds. The researcher identified phenolic compounds as well as total flavanol content in the developed cookies. The cocoa bean shell cookies have 1.68-2.37 mg gallic acid of phenolic compound and 0.10-0.19 mg epicatechin of total flavanol content [36].

Nonetheless, the prevailing studies failed to develop nutritional cookies that increase red blood cells and regulate menstrual bleeding, especially for perimenopausal women [37, 38]. The plantain flower powder with high amounts of protein, fiber, iron, calcium, magnesium and phytochemical compounds such as flavonoids and total phenol content could be used to develop cookies with a shelf life beneficial for perimenopausal women. Hence, the current study aims to develop and analyze the quality of cookies developed with plantain flowers (*Musa balbisiana* Colla).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Processing of plantain flower powder

Evenly sliced plantain flower was immersed in the rice-rinsed water for about thirty minutes to mitigate the enzymatic browning reaction. Later, it has been sun-dried for about 4 to 6 hours and pulverized into fine powder.

2.2. Formulation of product

Plantain flower cookies were developed in the food science laboratory in the SRM Medical College Hospital and Research Centre's Clinical Nutrition Department in Kattankulathur. The cookies have been developed into three different combinations of plantain flower powder. The three variations of cookies were prepared by incorporating plantain flower powder in 10%, 20%, 30% and the Control group. The composition of different variations of plantain flower cookies is depicted in Table 2.

Table 2. Composition of variations of plantain flower cookies (100 g)

Ingredients	Variation -1	Variation- 2	Variation- 3	Variation-4 (Control Group)
Wheat flour	40 g	30 g	20 g	55 g
Plantain flower powder	10 g	20 g	30 g	-
Cocoa powder	-	-	-	5 g
Skimmed milk powder	10 g.	10 g	10 g	10 g
Jaggery	10 g	10 g	10 g	10 g
Powdered sugar	10 g	10 g	10 g	10 g
Butter	10 g	10 g	10 g	10 g
Vanilla essence	1 tsp.	1 tsp.	1 tsp.	1 tsp.
Baking powder	1 tsp.	1 tsp.	1 tsp.	1 tsp.
Salt	A pinch	A pinch	A pinch	A pinch
Choco chips	5 g	5 g	5 g	-
Dry raisins	5 g	5 g	5 g	-

2.3. Procedure for preparation of plantain flower cookies

The calculated amount of plantain flower powder, wheat flour, and skimmed milk powder was mixed in the large bowl and then 1 tsp of baking powder and vanilla essence were added respectively. Later, a pinch of salt is added and the ingredients are mixed well. The powdered sugar, jaggery, and butter were blended using the minimum amount of water in a mixer jar. The batter was added to the flour mixture and kneaded into a dough using a little water. Later, the calculated raisins were mixed with dough. The dough was made into small balls of 17 g. each. Using a cookie cutter, the small balls were given a round shape and later choco chips were added to the top of the cookies. Finally, the cookies were baked in the microwave oven at 180 °C for about 15 minutes (Figure 1(A-F)). A similar method was followed for making standard chocolate cookies except for plantain flower powder, choco chips, and raisins.

2.4. Sensory evaluation

The sensory evaluation was performed by 25 semi-trained panel members using a 9-point hedonic scale. All five parameters such as appearance, aroma, taste, texture, and sweetness were

evaluated on the hedonic rating scale of 1 to 9. It ranges from dislike very much to like very much. By using the formula, the product acceptability index (PAI %) was assessed [39].

$$\text{PAI \%} = \frac{\text{Average grade obtained for a product}}{\text{Maximum grade given to a product}} \times 100$$

2.5. Nutrient analysis of the best-accepted product

To assess the nutrient content of the best-accepted product the fat, protein, sodium, dietary fiber, iron and potassium, AOAC 20th edition (2016) was utilized. Using IS 5949:1990, the minerals like magnesium and calcium were evaluated. Furthermore, IS 12711:1989 method was employed to assess the moisture content. Through the GCMS method, flavonoids and total phenol content were assessed. The energy and carbohydrates were assessed through FAO and CTL/SOP/FOOD/262-2014 methods respectively.

2.6. Shelf-Life of the best-accepted product

The shelf life study of the plantain flower cookies was evaluated under varied conditions such as packing in aluminum foil ventilated bags as well as without ventilation and stored for two months. The cookies were stored under the ambient of 30±2°C and refrigerated (5°C). The plantain flower cookies were prepared and tested on the 0th, 10th, 20th, 30th, 40th, 50th, and 60th day for microbiological quality and the standard chocolate cookies (control group) were also analyzed on the 0th, 10th, 20th, 30th, 40th, 50th, 60th day for microbiological quality.

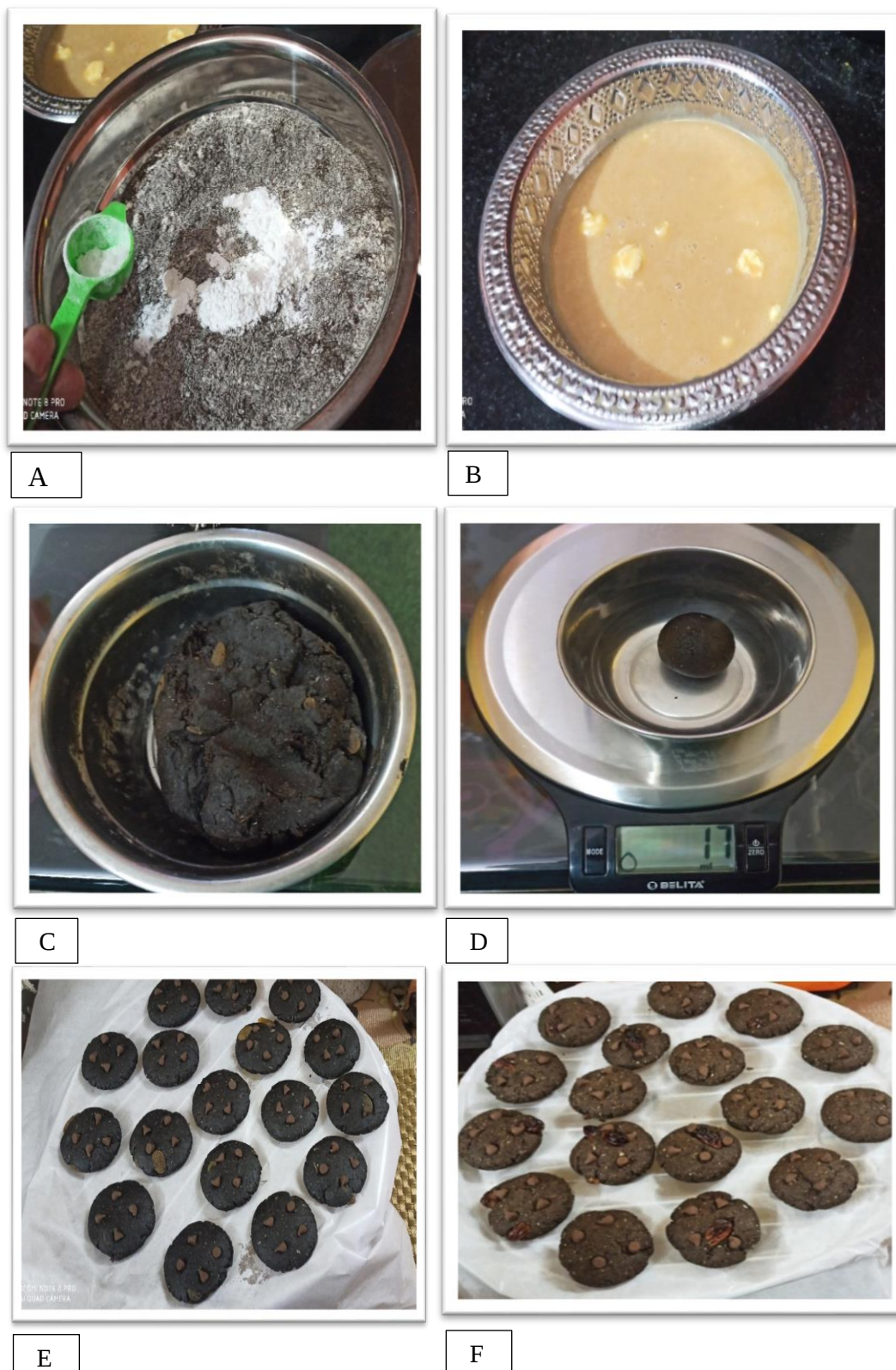


Figure 1. Preparation of Plantain flower cookies: (A) Mixture of wheat flour, plantain flower powder, milk powder with vanilla essence and baking powder, (B) jaggery, sugar and butter blended with little water, (C) batter and flour mixture kneaded to dough, (D) dough transferred to 17 g balls, (E) cookies topped with choco chips, (F) After baking.

3. RESULTS

3.1. Sensory Evaluation

The analysis of sensory parameters has been performed by the 25 semi-trained panel members to demonstrate the possible acceptability of novel products for achieving health benefits for women. Table 3 reveals the sensory evaluation of plantain flower cookie variants.

Table 3. Sensory evaluation of the *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) Cookie Variants

Sensory parameters	Variants			p value
	V1 Mean±SD	V2 Mean±SD	V3 Mean±SD	
Appearance	2.32±1.75 ^a	8.80±0.41 ^c	4.08±2.02 ^b	0.000
Aroma	2.64±1.78 ^a	7.72±0.74 ^b	3.24±1.83 ^a	0.000
Taste	3.20±2.22 ^a	8.00±1.26 ^b	3.92±1.47 ^a	0.000
Sweetness	2.76±1.89 ^a	7.44±1.36 ^b	3.52±1.47 ^a	0.000
Texture	2.52±1.58 ^a	7.60±0.76 ^c	3.64±2.14 ^b	0.000
Overall Acceptability	6.24±0.78 ^b	8.24±0.66 ^c	2.52±0.87 ^a	0.000

Values are expressed as mean and standard deviation (n=25). Statistically significant at $p < 0.05$, where ^{a<b<c} indicates a significant difference in the parameters among the variants of *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookies.

Table 3 illustrates the sensory parameters of the variants V1, V2 and V3. Meanwhile, V1 encompasses 10 g of plantain flower powder, V2 and V3 have 20 g and 30 g respectively. The appearance, aroma, taste, sweetness, texture are analyzed to detect the overall acceptability of the products. The appearance was found to be better in V2 cookies (8.80±0.41) compared to V1 (2.32±1.75) and V3 (4.08±2.02). Secondly, the aroma of the cookies was high in V2 variant (7.72±0.74) compared to V1 (2.64±1.78) and V3 (3.24±1.83). There is a rich taste in V2 (8.00±1.26) whereas V1 (3.20±2.22) and V3 (3.92±1.47) have a moderate taste (Figure 2). The sweetness is higher in V2 (7.44±1.36). Finally, the texture of the cookies has been analyzed and found to be 7.60±0.76. The overall acceptability among the three variants concluded by the panel member is V2 (8.24±0.66). Hence, V2 variant which encompasses 20 gm of plantain flower powder is the best variant compared to the other variants. The sensory parameters are higher in V2 cookies and it is considered to be an excellent cookie variant among others. Moreover, the significant value is less than 0.05 proving the noteworthy difference in parameters among the variants of plantain flower cookies.

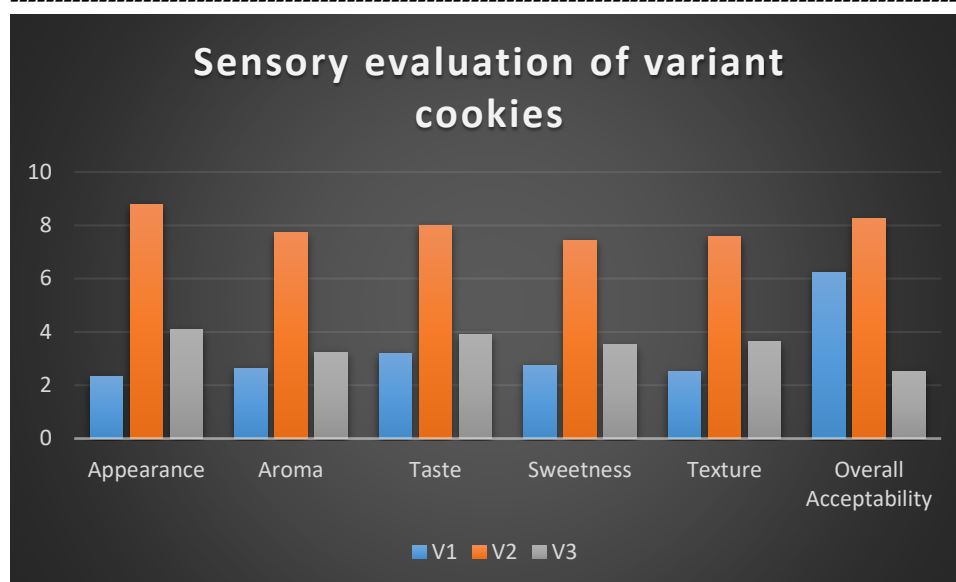


Figure 2. Sensory evaluation of the *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookie variants

Table 4 illustrates the sensory evaluation of the organoleptically superior variant of plantain flower and control cookies. The sensory parameters of appearance, aroma, taste, sweetness, and texture are evaluated. The appearance of the V2 variant (8.80 ± 0.41) is comparatively higher than that of the control cookie (Figure 3). Moreover, V2 has an excellent aroma (7.72 ± 0.74), rich taste (8.00 ± 1.26), high sweetness (7.44 ± 1.36) and reliable texture (7.60 ± 0.76). Therefore, the overall acceptability is analyzed and calculated to be 8.24 ± 0.66 . A p-value less than 0.05 proves the significant differences between the plantain flower and control cookies.

Table 4. Comparison of sensory evaluation of organoleptically superior variant of *Musa balbisiana* Colla (Plantain Flower) cookies and control cookies

Sensory parameters	Sample	Mean $\pm$ SD	t value	p value
Appearance	Control	4.28 $\pm$ 1.86	11.867	0.000
	V2	8.80 $\pm$ 0.41		
Aroma	Control	2.84 $\pm$ 1.55	14.247	0.000
	V2	7.72 $\pm$ 0.74		
Taste	Control	3.92 $\pm$ 1.42	10.787	0.000
	V2	8.00 $\pm$ 1.26		
Sweetness	Control	3.16 $\pm$ 1.11	12.227	0.000
	V2	7.44 $\pm$ 1.36		
Texture	Control	4.20 $\pm$ 2.59	6.278	0.000
	V2	7.60 $\pm$ 0.76		
Overall acceptability	Control	4.84 $\pm$ 1.31	11.558	0.000
	V2	8.24 $\pm$ 0.66		

Values are expressed as mean and standard deviation (n=25). Statistically significant at $p < 0.05$

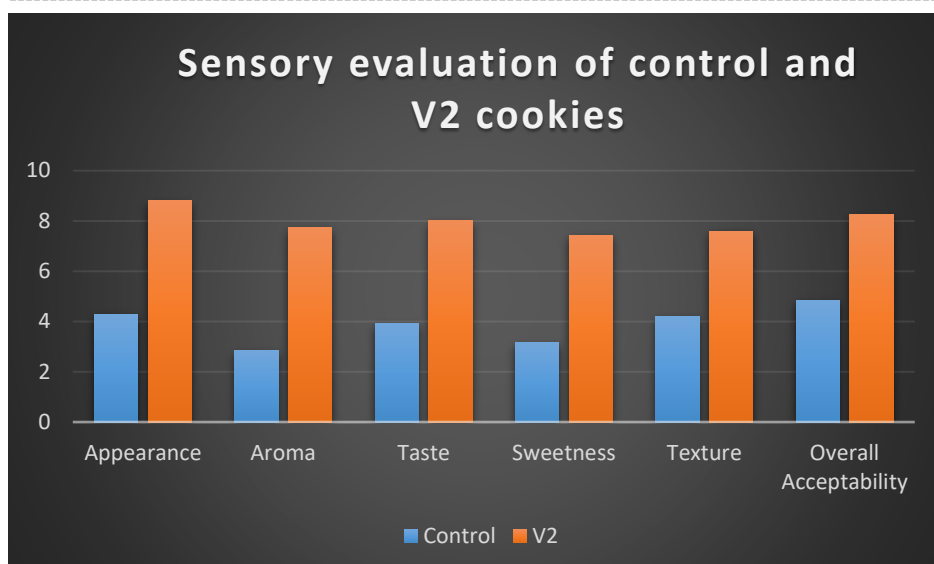


Figure 3. Sensory evaluation of V2 and control cookies

3.2. Nutritional analysis

The nutritional composition of plantain flower V2 cookies is 373.99 ± 9.90 kcal of energy, $66.53 \pm 2.25/100$ g of carbohydrate, $7.95 \pm 0.23/100$ g of total fat, 9.07 ± 0.23 g/100 g of protein, $9.69 \pm 1.27/100$ g of dietary fiber (Table 5). Moreover, plantain flowers V2 cookies have high amounts of micronutrients such as sodium (239.00 ± 34.83 mg/100 g) potassium (365.00 ± 22.11 mg/100 g), calcium (139.00 ± 32.45 mg/100 g), magnesium (131.33 ± 4.16 mg/100 g), and iron (4.80 ± 0.29 mg/100 g). The content of flavonoids (46.33 ± 11.06 mg/100 g) and phenol content (93.83 ± 8.75 mg/100 g).

Table 5. Nutrient composition of *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookies- V2

Nutrients	Mean $\pm$ SD
Energy (kcal/100 g)	373.99 $\pm$ 9.90
Carbohydrates (g/100 g)	66.53 $\pm$ 2.25
Total fat g/100g	7.95 $\pm$ 0.23
Protein (g/100 g)	9.07 $\pm$ 0.23
Dietary fiber g/100 g	9.69 $\pm$ 1.27
Sodium (mg/100 g)	239.00 $\pm$ 34.83
Potassium (mg/100 g)	365.00 $\pm$ 22.11
Calcium (mg/100 g)	139.00 $\pm$ 32.45
Magnesium (mg/100 g)	131.33 $\pm$ 4.16
Iron (mg/100 g)	4.80 $\pm$ 0.29
Moisture (g/100 g)	15.37 $\pm$ 1.43
Flavonoids (mg/100 g)	46.33 $\pm$ 11.06
Total phenol content (mg/100 g)	93.83 $\pm$ 8.75

The nutritional composition of control cookies is 387.41 ± 7.54 kcal of energy, $67.7 \pm 2.17/100$ g of carbohydrate, $8.93 \pm 0.13/100$ g of total fat, 8.89 ± 0.38 g/100 g of protein, $8.00 \pm 0.02/100$ g of dietary

fiber (Table 6). Moreover, control cookies have high amounts of micronutrients such as sodium (338.00 ± 2.00 mg/100 g) potassium (305.00 ± 6.25 mg/100 g), calcium (118.00 ± 12.17 mg/100 g), magnesium (123.33 ± 19.14 mg/100 g), and iron (3.81 ± 0.37 mg/100 g). The content of flavonoids (27.80 ± 0.56 mg/100 g) and phenol content (70.00 ± 2.00 mg/100 g).

Table 6. Nutrient composition of standard chocolate cookies

Nutrients	Mean $\pm$ SD
Energy (kcal/100 g)	387.41 $\pm$ 7.54
Carbohydrates (g/100 g)	67.7 $\pm$ 2.17
Total fat (g/100 g)	8.93 $\pm$ 0.13
Protein (g/100 g)	8.89 $\pm$ 0.38
Dietary fiber (g/100 g)	8.00 $\pm$ 0.02
Sodium (mg/100 g)	338.00 $\pm$ 2.00
Potassium (mg/100 g)	305.00 $\pm$ 6.25
Calcium (mg/100 g)	118.00 $\pm$ 12.17
Magnesium (mg/100 g)	123.33 $\pm$ 19.14
Iron (mg/100 g)	3.81 $\pm$ 0.37
Moisture (g/100 g)	114.07 $\pm$ 0.67
Flavonoids (mg/100 g)	27.80 $\pm$ 0.56
Total phenol content (mg/100 g)	70.00 $\pm$ 2.00

The comparative analysis of the plantain flower and standard chocolate cookies are demonstrated. The energy, carbohydrate and total fat content are found to be higher in the standard chocolate cookies (Table 7). Since the carbohydrate content is low, which elevates the oil absorption making the dough appropriate for making cookies. Alternatively, the plantain flower variant V2 cookies are rich in protein and dietary fiber content (Figure 4). The high level of fiber content present in the plantain flower V2 cookies will improvise the digestion. The iron content is rich in the variant V2 cookies and less moisture content which makes the plantain flower cookies more crispier. The phenol content is higher in plantain flower V2 cookies. Therefore, the consumption of plantain flower V2 cookies might improve the health status than the standard chocolate cookies prevailed in the market.

Table 7. Comparison of nutrient composition of *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookies- V2 and standard chocolate cookies- Control

Nutrients	V2 Mean $\pm$ SD	Control Mean $\pm$ SD	t value	p value
Energy (kcal/100 g)	373.99 $\pm$ 9.90	387.41 $\pm$ 7.54	1.867	0.135
Carbohydrates (g/100 g)	66.53 $\pm$ 2.25	67.7 $\pm$ 2.17	0.739	0.501
Total fat (g/100 g)	7.95 $\pm$ 0.23	8.93 $\pm$ 0.13	6.417	0.003
Protein (g/100 g)	9.07 $\pm$ 0.23	8.89 $\pm$ 0.38	0.714	0.515
Dietary fiber (g/100 g)	9.69 $\pm$ 1.27	8.00 $\pm$ 0.02	2.304	0.083
Sodium (mg/100 g)	239.00 $\pm$ 34.83	338.00 $\pm$ 2.00	4.915	0.008
Potassium (mg/100 g)	365.00 $\pm$ 22.11	305.00 $\pm$ 6.25	4.523	0.011

Calcium (mg/100 g)	139.00±32.45	118.00±12.17	1.050	0.353
Magnesium (mg/100 g)	131.33±4.16	123.33±19.14	0.707	0.518
Iron (mg/100 g)	4.80±0.29	3.81±0.37	3.595	0.023
Moisture (g/100 g)	15.37±1.43	114.07±0.67	1.428	0.227
Flavonoids (mg/100 g)	46.33±11.06	27.80±0.56	2.899	0.044
Total phenol content (mg/100 g)	93.83±8.75	70.00±2.00	4.598	0.010

Values are expressed as mean and standard deviation (n=3). Statistically significant at $p < 0.05$.

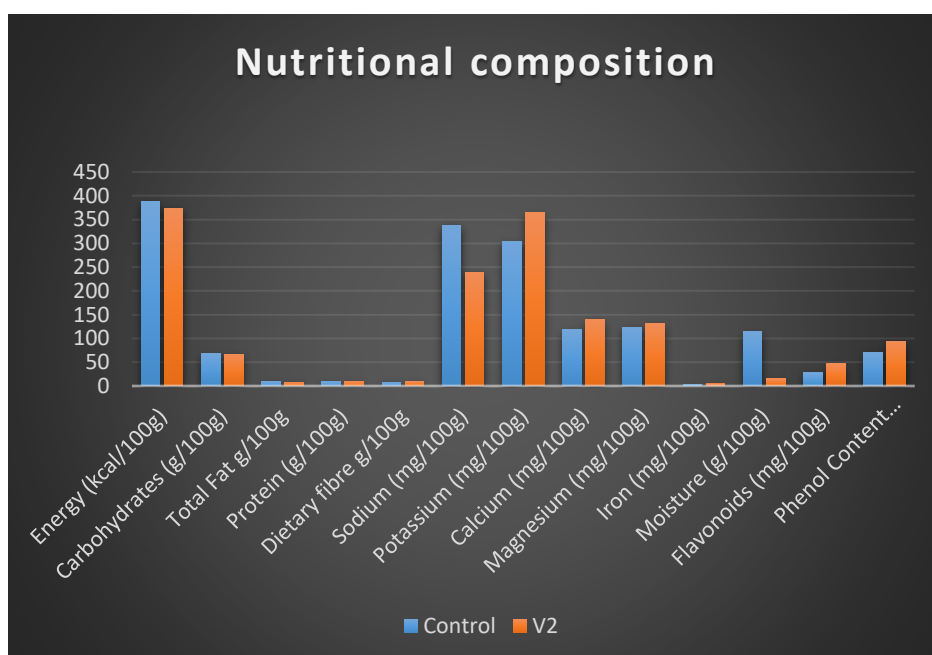


Figure 4. Nutrient composition of V2 and standard wheat cookies

3.3. Shelf life of the cookies

The shelf life of the plantain flower V2 cookies (experimental) and standard chocolate cookies (control) are analyzed. The significant “p” value and “t” value are estimated in order to assess the shelf life of the products for 10th, 20th, 30th, 40th, 50th and 60th days.

Table 8 illustrates the sensory parameters of the experimental and control cookies for the duration of 10, 20, 30, 40, 50 and 60th day. The color of the plantain flower cookies (9.00±0.00) are seems to be better than the standard wheat cookies (Figure 5). The color of the standard chocolate cookies gradually fades in the consecutive days of 20th to 60th. Comparatively, the experimental cookies are exhibiting attractive color rather than the standard chocolate cookies. The appeal of the plantain flower cookies are comparatively possessing higher scores than the standard wheat cookies (9.00±0.00). The taste and texture of the plantain flower cookies are also observed to be better than the standard wheat cookies (Figure 6). Finally, the overall acceptability of plantain flower cookies was observed to be most acceptable cookie. It also registers the significant value less than 0.05. In some of the parameters, the “t” value is not computed due to the similar standard deviation among two groups.

Table 8. Comparison of sensory qualities of the *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookies- V2 and standard chocolate cookies- Control during the period of storage

Sensory parameter	Test day	Group	Mean±SD	t	P
Color	10th day	Experimental	9.00±0.00	4.58	0.00
		Control	8.30±0.48		
	20th day	Experimental	8.40±0.52	1.57	0.13
		Control	8.10±0.32		
	30th day	Experimental	8.20±0.42	4.44	0.00
		Control	7.30±0.48		
	40th day	Experimental	7.80±0.42	2.47	0.02
		Control	7.30±0.48		
	50th day	Experimental	7.80±0.42	3.13	0.01
		Control	7.10±0.57		
	60th day	Experimental	7.70±0.48	4.43	0.00
		Control	6.50±0.71		
Appearance	10th day	Experimental	9.00±0.00	3.00	0.01
		Control	8.50±0.53		
	20th day	Experimental	8.90±0.32	4.20	0.00
		Control	8.20±0.42		
	30th day	Experimental	8.30±0.48	1.96	0.07
		Control	8.00±0.00		
	40th day	Experimental	8.60±0.52	5.81	0.00
		Control	7.30±0.48		
	50th day	Experimental	8.10±0.32	5.40	0.00
		Control	7.20±0.42		
	60th day	Experimental	8.00±0.00	9.00	0.00
		Control	6.80±0.42		
Aroma	10th day	Experimental	9.00±0.00 ^a		
		Control	8.00±0.00 ^a		
	20th day	Experimental	8.80±0.42	6.00	0.00
		Control	8.00±0.00		
	30th day	Experimental	8.80±0.42	6.00	0.00
		Control	8.00±0.00		
	40th day	Experimental	8.70±0.48	5.81	0.00
		Control	7.40±0.52		
	50th day	Experimental	8.90±0.32	10.20	0.00
		Control	7.20±0.42		
	60th day	Experimental	7.80±0.63	3.76	0.00
		Control	6.70±0.67		
Taste	10th day	Experimental	9.00±0.00	3.67	0.00
		Control	8.40±0.52		
	20th day	Experimental	9.00±0.00 ^a		
		Control	8.00±0.00 ^a		
	30th day	Experimental	9.00±0.00 ^a		
		Control	8.00±0.00 ^a		
	40th day	Experimental	8.60±0.52	4.33	0.00
		Control	7.60±0.52		

	50th day	Experimental	8.30±0.48	4.02	0.00
		Control	7.40±0.52		
	60th day	Experimental	8.00±0.00	3.21	0.00
		Control	7.20±0.79		
Texture	10th day	Experimental	9.00±0.00 ^a		
		Control	9.00±0.00 ^a		
	20th day	Experimental	8.60±0.52	1.34	0.20
		Control	8.30±0.48		
	30th day	Experimental	8.40±0.52	2.45	0.02
		Control	8.00±0.00		
	40th day	Experimental	8.00±0.00	2.45	0.02
		Control	7.60±0.52		
	50th day	Experimental	7.70±0.48	1.85	0.08
		Control	7.30±0.48		
	60th day	Experimental	7.60±0.52	4.02	0.00
		Control	6.70±0.48		
Overall acceptability	10th day	Experimental	9.00±0.00	3.67	0.00
		Control	8.40±0.52		
	20th day	Experimental	8.80±0.42	2.47	0.02
		Control	8.30±0.48		
	30th day	Experimental	8.00±0.00 ^a		
		Control	8.00±0.00 ^a		
	40th day	Experimental	8.00±0.00	1.00	0.33
		Control	7.90±0.32		
	50th day	Experimental	7.90±0.32	2.06	0.05
		Control	7.50±0.53		
	60th day	Experimental	7.70±0.48	0.88	0.39
		Control	7.50±0.53		

Values are expressed as mean and standard deviation (n=10). Statistically significant at $p < 0.05$. ^a t cannot be computed because the standard deviations of both groups are 0.

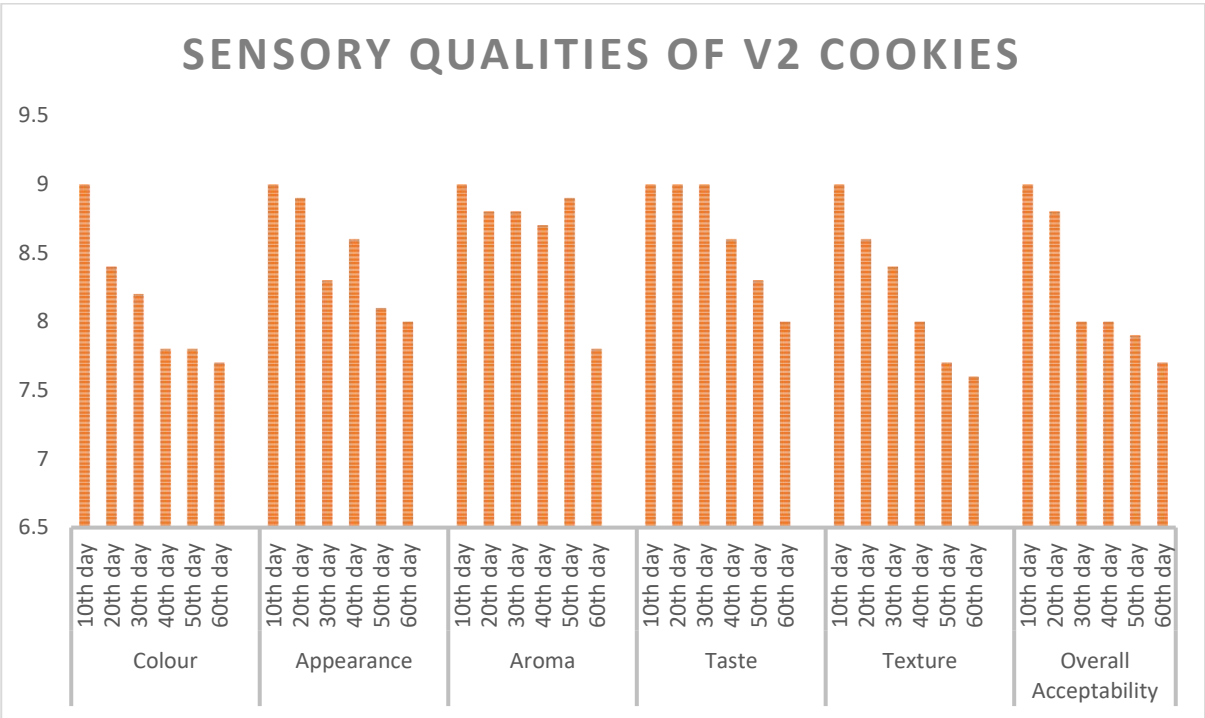


Figure 5. Sensory qualities of V2 cookies

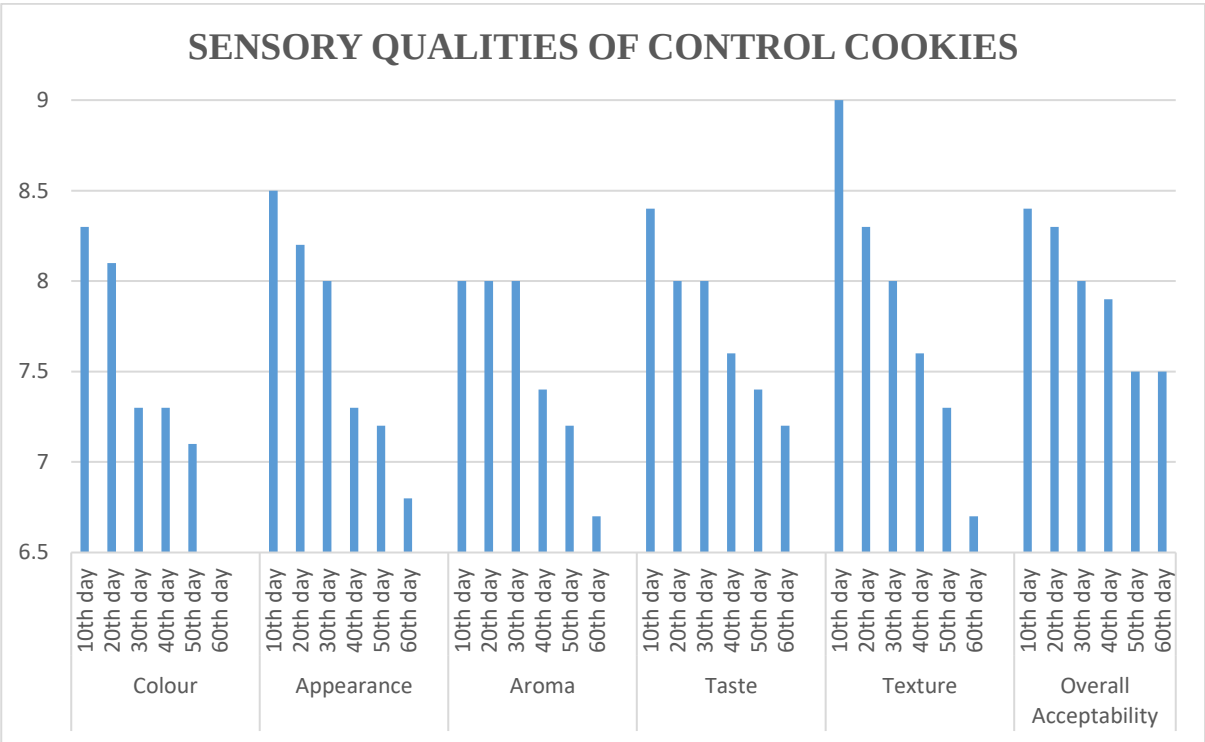


Figure 6. Sensory qualities of control cookies

Table 9 illustrates the chemical parameters of the experimental and control cookies for the duration of 10, 20, 30, 40, 50 and 60th day. The peroxide value of the plantain flower cookies (8.62±0.20 mcq/kg) seems to be better than the standard chocolate cookies. The value gradually elevates in the consecutive days of 20th to 60th. Comparatively, the experimental cookies exhibit higher peroxide value rather than the standard chocolate cookies. The moisture of the plantain

flower cookies possesses less value than the standard chocolate cookies (5.06 ± 0.02 g/m³). From the analysis, it has been proven that the moisture content of the standard chocolate cookies was higher and increased from 20th to 60th day of storage. The antioxidant capacity of the plantain flower cookies are also observed to be better than the standard chocolate cookies. Finally, the pH level of plantain flower cookies was observed to be greater than that of standard chocolate cookies. Both the cookies possess an acceptable value pH value of 5-6. Hence, from the above analysis the nutritional composition and shelf life of *Musa balbisiana* Colla has been evaluated and compared with the control group cookies.

Table 9. Comparison of chemical parameters of the *Musa balbisiana* Colla (plantain flower) cookies-V2 and standard chocolate cookies- Control during the period of storage

Sensory parameter	Test day	Group	Mean $\pm$ SD	t	p
Peroxide value (mcq per kg of sample fat)	10th day	Experimental	8.62 $\pm$ 0.20	6.26	0.00
		Control	7.62 $\pm$ 0.20		
	20th day	Experimental	8.74 $\pm$ 0.19	6.60	0.00
		Control	7.74 $\pm$ 0.19		
	30th day	Experimental	8.90 $\pm$ 0.21	6.24	0.00
		Control	7.89 $\pm$ 0.19		
	40th day	Experimental	9.00 $\pm$ 0.19	5.52	0.01
		Control	8.07 $\pm$ 0.22		
	50th day	Experimental	9.12 $\pm$ 0.12	3.98	0.02
		Control	8.38 $\pm$ 0.30		
	60th day	Experimental	9.21 $\pm$ 0.12	3.10	0.04
		Control	8.39 $\pm$ 0.44		
Moisture Level (gm/m ³)	10th day	Experimental	5.06 $\pm$ 0.02	1.14	0.32
		Control	5.13 $\pm$ 0.12		
	20th day	Experimental	5.19 $\pm$ 0.07	1.90	0.13
		Control	5.37 $\pm$ 0.16		
	30th day	Experimental	5.29 $\pm$ 0.05	4.88	0.01
		Control	5.60 $\pm$ 0.10		
	40th day	Experimental	5.37 $\pm$ 0.03	8.75	0.00
		Control	6.26 $\pm$ 0.17		
	50th day	Experimental	5.44 $\pm$ 0.03	8.78	0.00
		Control	6.39 $\pm$ 0.19		
	60th day	Experimental	5.57 $\pm$ 0.03	7.02	0.00
		Control	6.54 $\pm$ 0.24		
Antioxidant Capacity	10th day	Experimental	17.81 $\pm$ 0.52	1.41	0.23
		Control	17.13 $\pm$ 0.64		
	20th day	Experimental	20.51 $\pm$ 1.84	1.11	0.33
		Control	19.17 $\pm$ 0.98		
	30th day	Experimental	23.30 $\pm$ 2.52	0.89	0.42
		Control	21.63 $\pm$ 2.05		
	40th day	Experimental	27.43 $\pm$ 3.00	0.88	0.43
		Control	25.83 $\pm$ 0.91		
	50th day	Experimental	31.07 $\pm$ 3.23	0.67	0.54
		Control	29.70 $\pm$ 1.47		
	60th day	Experimental	37.15 $\pm$ 3.97	1.12	0.32
		Control	34.47 $\pm$ 1.21		

pH Level	10th day	Experimental	5.74±0.02	2.03	0.11
		Control	5.37±0.32		
	20th day	Experimental	6.21±0.19	1.62	0.18
		Control	5.83±0.35		
	30th day	Experimental	6.38±0.14	- 0.07	0.95
		Control	6.39±0.10		
	40th day	Experimental	6.68±0.12	0.78	0.48
		Control	6.59±0.17		
	50th day	Experimental	6.80±0.02	0.69	0.53
		Control	6.77±0.06		
	60th day	Experimental	6.93±0.06	1.41	0.23
		Control	6.87±0.06		

Values are expressed as mean and standard deviation (n=3). Statistically significant at $p < 0.05$.

4. DISCUSSION

In the present research, the plantain flower cookies are found to be highly nutritious, since the plantain flower powder utilized in the cookies preparation are enriched with high nutrient content. Meanwhile, the cookies developed utilizing the plantain flower powder was found to be more nutritious compared to the standard wheat cookies [40]. Likewise, the cake prepared from the plantain flower subjected to rice rinsed water about thirty minutes seems to be highly nutritious compared to standard wheat cake [23]. The plantain flower cookies manufactured with the 20% variants found to be more acceptable compared to the 10 and 30% variants. Therefore, the product acceptability minimizes with the high level of incorporation of flour [41]. Likewise, the outcomes acquired by the researcher for the preparation of humus which incorporated the plantain flower powder in differential concentrations of 18 g, 20 g and 25 g [42]. The humus manufactured with the 20 g plantain flower powder was observed to be highly acceptable. Also, the present research conveys that 20 g of plantain flower powder has been proved to be optimal compared to 10 and 30 g variants.

The prevailing research by Zehla [43] reveals that the sensory test scores for overall acceptability of plantain flower powder shows that 35% variants was effectual compared to 50% and 60% variation. Moreover, 65% of plantain flower powder has the least score of taste and overall acceptability. The present research had the highest score of taste as well as acceptability with 20% variants compared with 10% and 30% variants. On contrary, the existing research by Tasnim *et al.* [23] revealed that amongst the four variants of the wheat bread developed by addition of plantain flower powder in the differential variation of 25%, 20%, 15% and 10%, the 10% variation observed to be the optimal product. The product acceptability varies with the concentration of plantain flower powder.

The cookies produced from Moringa leaf and fermented sweet detar shows the overall acceptability of 8.13 [44]. The sensory score of aroma (7.60), appearance (8.26), taste (7.60) and texture (7.46). The present research conveys that the plantain flower cookies has the overall acceptability of 9.00. Ertaş *et al.* [28] reported that the utilization of raw and roasted hemp flour elevates the total phenol content, protein, ash and fat content. The hemp flour content minimizes the hardness and leads to formation of softer cookies. The nutritional value of the cookies are found to be higher in the addition of hemp seed to cookies. The plantain flower cookies are also found to exhibit high nutritional content. Pinto *et al.* [29] conveys that the utilization

of chest-nut shell in the cookies production possessed carbohydrates (53.92%), fat (32.62%) and fiber (5.15%). The anti-oxidant effects evident the bioactivity of the cookies. The sensory evaluation has excellent scores in all parameters greater than 6.25. Moreover, the phenolic acids and flavonoids are present in the cookies. The plantain flower cookies has better scores in sensory attributes compared to control cookies.

The dietary fiber, fats, carbohydrates, phenolic contents of concentrated fiber powder from chiku were observed to be greater compared to the wheat flour cookies. On contrary, the moisture content and total protein content were lower in chiku cookies. The cookies found to be superior fiber source, phenolic content and scavenging activity. The cookies containing 7% of chiku fiber possess highest sensory score [45]. The plantain flower cookies with 20 g has high value of sensory parameters compared to the 10 and 30 g of plantain flower powder. The increased proportion of oat flour and fenugreek in the cookies elevates the mineral content, fiber, protein, ash. Also, it proves that the sensory attributes reduced with the elevating proportion of oat and fenugreek [46]. The plantain flower powder of 30 g (V3) variant cookies has less value of sensory attributes.

5. CONCLUSION

Plantain flowers enriched with the nutrients are intensively utilized to formulate cookies that aids to overcome the perimenopausal symptoms. According to the evaluated scores and overall analysis, the present research concludes that plantain flower cookies exhibits an ample quantity of nutrients. Moreover, it is observed to be quality products with satisfied sensory acceptance. A notable variation in the nutrient composition of plantain flower cookies detected probable utilization of plantain flower as a healthy ingredient in the cookies preparation. The cookies prevailed in the market, the nutrients were comparatively lesser due to by-products processing prior to the product formulation. The sensory evaluation and nutritional analysis evident that the plantain flower cookies exhibits better composition of nutrients compared to the standard chocolate cookies. Additionally, the anti-oxidant of plantain flower cookies are seems to be better than the standard wheat cookies. The anti-oxidant properties aids in achieving the quality life of consumers. The formulated plantain flower cookies retain its sensory characteristics till 60th day. Therefore, the present research develops the nutritional enriched cookies with plantain flower which contributes to the incredible women community who suffers from perimenopausal symptoms and it generates nutritional awareness to the community.

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

1. C. Gouel & H. Guimbard. Nutrition transition and the structure of global food demand. *Am. J. Agricult. Econom.*, **101**(2), 383–403 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1093/ajae/aay030>
2. H. Hemilä & E. Chalker. Vitamin C can shorten the length of stay in the ICU: a meta-analysis. *Nutrients*, **11**(4), 708 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/nu11040708>

3. D. Sharma, C.C. Baruah, P. Narzary & M.P. Sarma. Estimation of micronutrient content and dietary fibre in *Musa balbisiana* seeds and blossom. *Res. J. Agricult. Sci.*, **13**(1), 159–161 (2022). URL: <http://rjas.org/ViewIssue?IssueId=78>
4. S. Kraithong & U. Issara. A strategic review on plant by-product from banana harvesting: A potentially bio-based ingredient for approaching novel food and agro-industry sustainability. *J. Saudi Soc. Agricult. Sci.*, **20**(8), 530–543 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.06.004>
5. A. Kumari, E. Rao & A. Agarwal. A review on by-product utilization of plantain. *J. Postharvest Technol.*, **11**(3), 138–153 (2023). URL: <https://acspublisher.com/journals/index.php/jpht/article/view/15011>
6. A.G. Nanjappanavar, S. Patil, M.S. Lokesh, K. Gandolkar & R. Hadlegeri. Influence of different growing conditions on growth parameters of banana varieties. *J. Exp. Agricult. Int.*, **46**(5), 686–715 (2024). Doi: <https://doi.org/10.9734/jeai/2024/v46i52423>
7. S. Sarker, S.D. Shuvo, M. Takey, T. Akter, M. Hadaytullah, M.S. Al Reza & M.A. Zubair. Determination of proximate composition, antioxidant activity, vitamin C, total phenolic and flavonoid content of banana blossom powder for optimization of its use. *Annals Food Science & Technology*, **23**(2), 299–304 (2022). URL: https://www.researchgate.net/publication/371833762_DETERMINATION_OF_PROXIMATE_COMPOSITION_ANTIOXIDANT_ACTIVITY_VITAMIN_C_TOTAL_PHENOLIC_AND_FLAVONOID_CONTENT_OF_BANANA_BLOSSOM_POWDER_FOR_OPTIMIZATION_OF_ITS_USE
8. D. Soni & G. Saxena. Analysis of physico-chemical and functional properties of banana flower. *Res. J. Agricult. Sci.*, **12**(6), 2020–2023 (2021).
9. K.N.R. Kumar & M.S. Kumar. Performance of drip irrigation system in banana cultivation-data envelopment analysis approach. *Agribusiness and Information Management*, **8**(1), 17–26 (2016). URL: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201631261180834.pdf>
10. S. Sau, P. Bhattacharjee, P. Kundu & D. Mandal. Banana. In: *Tropical and Subtropical Fruit Crops: Production, Processing, and Marketing*. Edited by: D. Mandal, U. Wermund, L. Phavaphutanon & R. Cronje. Apple Academic Press, Inc., Palm Bay (FL), U.S.A., 2023; pp. 1–62. Doi: <https://doi.org/10.1201/9781003305033>
11. J.Z. Agcaoili. Level of acceptability of banana inflorescence (*Musa paradisiaca*) pickle. *Herculean Journal*, **1**(1), 6 (2023). URL: <https://herculeanjournal.com/index.php/main/article/view/6>
12. C. Panyayong & K. Srikaeo. Foods from banana inflorescences and their antioxidant properties: An exploratory case in Thailand. *Int. J. Gastronomy Food Sci.*, **28**, 100436 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100436>
13. M.H. Kavya, R. Manasa, M. Deepika & R.S.N. Mahesh-Shivananjappa. A review on banana flower: Nutritional composition, processed products and health benefits. *IP Journal of Nutrition, Metabolism and Health Science*, **6**(3), 110–115 (2023). Doi: <https://doi.org/10.18231/j.ijnmhs.2023.019>
14. N.S.M. Suffi, E. Mohamed, S.N. Camalxaman, A.S. Rambely & N. Haron. The medicinal benefits, phytochemical constituents and antioxidant properties of banana blossom: A mini review. *Healthscope: The Official Research Book of Faculty of Health Sciences*, **4**(1), 113–118 (2021). URL: <https://www.healthscopefsk.com/index.php/research/article/view/243/183>
15. S. Uma, S.P. Kumar & A.D. Keran. Production of high-value compounds and innovative future products from banana: creation of robust circular economy. *Int. J. Innovat. Hortic.*, **11**(2), 243–258 (2022). Doi : <https://doi.org/10.5958/2582-2527.2022.00021.5>
16. Y.A. Begum & S.C. Deka. Chemical profiling and functional properties of dietary fibre rich inner and outer bracts of culinary banana flower. *J. Food Sci. Technol.*, **56**(12), 5298–5308 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04000-4>
17. T. Nofianti, A. Muhtadi, I. Fidrianny, A. Fuadah & V. Nurviana. Klutuk banana (*Musa balbisiana* Colla) peel fractions: antioxidant and antihyperglycemic potential. *Int. J. Appl. Pharmaceut.*, **13**(2), 1–6 (2020). Doi: <https://doi.org/10.22159/ijap.2021.v13s2.01>
18. G. Gopalan, B. Prabha, A. Joe, T.R. Reshmitha, D.R. Sherin, B. Abraham, M. Sabu, T.K. Manojkumar, K.V. Radhakrishnan & P. Nisha. Screening of *Musa balbisiana* Colla. seeds for antidiabetic

-
- properties and isolation of apiforol, a potential lead, with antidiabetic activity. *J. Sci. Food Agricult.*, **99**(5), 2521–2529 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9462>
19. M.Y. Chowdary, S.S. Rana & P. Ghosh. Banana inflorescence and their potential health benefits as future food. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, **14**(2), 131–136 (2022). Doi: <https://doi.org/10.15586/qas.v14i2.1066>
 20. B.F. Lau, K.W. Kong, K.H. Leong, J. Sun, X. He, Z. Wang, M.R. Mustafa, T.C. Ling & A. Ismail. Banana inflorescence: Its bio-prospects as an ingredient for functional foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **97**, 14–28 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.023>
 21. M. Phinyo, P. Sangarun, E. Wangkahart & K. Sujipuri. Effects of banana flower powder (*Musa* sp.) supplementation on growth performance, whole body composition, antioxidant and immune responses, gene expression and liver histology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Sci. Technol.*, **308**, 115882 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115882>
 22. A. Das, J. Bindhu, P. Deepesh, G.S. Priya & S. Soundariya. *In vitro* anticancer study of bioactive compound isolated from Musa extract (*Musa acuminata*). *Indian J. Public Health Res. Develop.*, **11**(1), 340–346 (2020). Doi: <https://doi.org/10.37506/v11/i1/2020/ijphrd/193841>
 23. T. Tasnim, P.C. Das, A.A. Begum, A.H. Nupur & M.A.R. Mazumder. Nutritional, textural and sensory quality of standard wheat cake enriched with rice rinsed water treated banana blossom flour. *J. Agricult. Food Res.*, **2**, 100071 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100071>
 24. I.H. Mondal, L. Rangan & R.V. Uppaluri. Parametric optimality of tray dried *Musa balbisiana* Colla blossom. *J. Food Sci. Technol.*, **57**(2), 4599–4612 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04498-z>
 25. H.J.G. Omar, M.G.M. Regio, J.C.D. Peña, N.T. Lim, M.S. Andal, G.Q. De Guzman, C. Diaz-Santiago, J.K. Tiongson-Ecalne, L.M. Chicombing De Guzman, S.S. Montemayor, J.D. Reyes-Lapig & J.P. Dela Torre-Ramos. Proximate composition and antioxidant activity of the saba (*Musa acuminata* x *balbisiana* Colla) banana blossom family Musaceae. *GSC Biol. Pharm. Sci.*, **21**(2), 026–032 (2022). Doi: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.21.2.0418>
 26. K. Sitthiya, L. Devkota, M.B. Sadiq & A.K. Anal. Extraction and characterization of proteins from banana (*Musa Sapientum* L) flower and evaluation of antimicrobial activities. *J. Food Sci. Technol.*, **55**, 658–666 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2975-z>
 27. P.A. Pawase & S.J. Veer. Utilization of Black cumin seed (*Nigella sativa* L.) fractions on quality characteristics of cookies. *Int. J. Pharm. Life Sci.*, **1**(1), 16–22 (2020). Doi: <https://doi.org/10.33545/27072827.2020.v1.i1a.4>
 28. N. Ertaş & M. Aslan. Antioxidant and physicochemical properties of cookies containing raw and roasted hemp flour. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **19**(2), 177–184 (2020). Doi: <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2020.0795>
 29. D. Pinto, M.M. Moreira, E.F. Vieira, J. Švarc-Gajić, A. Vallverdú-Queralt, T. Brezo-Borjan, C. Dele-rue-Matos & F. Rodrigues. Development and characterization of functional cookies enriched with chestnut shells extract as source of bioactive phenolic compounds. *Foods*, **12**(3), 640 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/foods12030640>
 30. M. Chakraborty, S. Budhwar & S. Kumar. Evaluation of nutrients and organoleptic value of novel value added multibran cookies using multivariate approach. *J. Food Sci. Technol.*, **59**(12), 4748–4760 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05559-1>
 31. A. Krajewska & D. Dziki. Enrichment of cookies with fruits and their by-products: Chemical composition, antioxidant properties, and sensory changes. *Molecules*, **28**(10), 4005 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28104005>
 32. N. Alcântara-Brandão, M. Borges de Lima-Dutra, A.L. Andrade-Gaspardi & M.R. Segura-Campos. Chia (*Salvia hispanica* L.) cookies: physicochemical/microbiological attributes, nutrimental value and sensory analysis. *J. Food Measur. Charact.*, **13**, 1100–1110 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-00025-z>
 33. N.A. Bhat, A.M. Hamdani & F.A. Masoodi. Development of functional cookies using saffron extract. *J. Food Science Technol.*, **55**(12), 4918–4927 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3426-1>
-

34. T. Bansal, A. Kawatra & V. Sangwan. Sensorial, nutritional and shelf life evaluation of bio-fortified millet based cookies supplemented with carrot powder and sesame. *Asian J. Dairy Food Res.*, **41**(1), 83–88 (2022). Doi: <https://doi.org/10.18805/ajdfr.DR-1696>
35. D. Kulkarni, B. Sakhale & R. Chavan. Studies on development of low gluten cookies from pearl millet and wheat flour. *Food Res.*, **5**(4), 114–119 (2021). URL: https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/_15__fr-2021-028_kulkarni_2.pdf
36. I.D. Soares, M.E.M. Cirilo, I.G. Junqueira, F.M. Vanin & C.E.d.C. Rodrigues. Production of cookies enriched with bioactive compounds through the partial replacement of wheat flour by cocoa bean shells. *Foods*, **12**(3), 436 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/foods12030436>
37. R.E. Nappi, R. Kroll, E. Siddiqui, B. Stoykova, C. Rea, E. Gemmen & N.M. Schultz. Global cross-sectional survey of women with vasomotor symptoms associated with menopause: prevalence and quality of life burden. *Menopause*, **28**(8), 875–882 (2021). <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001793>
38. E.R. Duralde, T.H. Sobel & J.E. Manson. Management of perimenopausal and menopausal symptoms. *BMJ*, **382**, e072612 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-072612>
39. C.D. da Silva, D.R. de Oliveira, I.T. Perrone, C.H. Fonseca & E.S. Garcia. Low-fat, lactose-free and leucine-enriched chocolate cow milk prototype: A preliminary study on sensorial acceptability and gastrointestinal comstandard wheatts following exhaustive exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, **18**(1), 14 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00406-0>
40. A.B. Duruanyanwu, A.T. Victor-Aduloju & J.E. Obiegbuna. Proximate composition and microbiological evaluation of cookies produced from whole wheat flour, unripe plantain flour (*R. markham*) and *Moringa oleifera* leaf powder. *Asian J. Food Res. Nutr.*, **2**(4), 571–582 (2023). URL: <https://www.journalajfrn.com/index.php/AJFRN/article/view/79/154>
41. A.A. Badejo, A.P. Osunlakin, A. Famakinwa, A.O. Idowu & T.N. Fagbemi. Analyses of dietary fibre contents, antioxidant composition, functional and pasting properties of plantain and *Moringa oleifera* composite flour blends. *Cogent Food & Agriculture*, **3**(1), 1278871 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1278871>
42. F. Liu, Y. Peng, Y. Qiao, Y. Huang, F. Song, M. Zhang & F. Song. Consumption of flavonoids and risk of hormone-related cancers: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrition J.*, **21**(1), 27 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12937-022-00778-w>
43. P.F. Zehla, D. Vijayalakshmi, V.C. Suvarna & S. Yatnatti. Processing of banana peel and blossom and its application in food products. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, **7**(8), 1243–1250 (2018). URL: <https://ijcmas.com/7-8-2018/P.%20Fathima%20Zehla,%20et%20al.pdf>
44. B. Igbabul, M.D. Ogunrinde & J. Amove. Proximate, micronutrient composition, physical and sensory properties of cookies produced with wheat, sweet detar and moringa leaf flour blends. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.*, **6**(3), 690–699 (2018). Doi: <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.3.11>
45. S.Z. Asadi, M.A. Khan & R.V. Chamarchy. Development and quality evaluation of cookies supplemented with concentrated fiber powder from chiku (*Manilkara zapota* L.). *J. Food Sci. Technol.*, **58**(5), 1839–1847 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04695-w>
46. A. Negu, A. Zegeye & T. Astatkie. Development and quality evaluation of wheat based cookies enriched with fenugreek and oat flours. *J. Food Sci. Technol.*, **57**(10), 3573–3580 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04389-3>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

S.P. Prakash & S.S. Kumbamoorthy. Development and quality assessment of plantain flower [*Musa balbisiana* Colla] cookies: Beneficial for perimenopausal women. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 68–88 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116324>

Clinical research article

Investigation of the attitudes and experiences of pediatricians toward telehealth use during this pandemic (COVID-19) era

Sunanda Jha*, Upendra Prasad Sahu & Bhardwaj Narayan Chaudhary

Department of Paediatrics, Rajendra Institute of Medical Sciences, Ranchi, Jharkhand, India.

*Corresponding author e-mail: sunandajha2022@gmail.com

Received: November 13, 2024

Corrected: December 20, 2024

Accepted: December 27, 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117544>

SUMMARY

Objectives: Motivated by the increased popularity of the telemedicine system, this study explored the influence of treatment effectiveness and its organizational characteristics on the adoption of telehealth among pediatric health professionals. . The pandemic situation urges the need to conduct such studies to reveal plans for adopting telehealth systems. **Methods:** This article analyzed various state-of-the-art methods and designed a well-structured questionnaire comprising technically strong questions related to the objective of the study. The work engaged 90 participants, of whom 30 were excluded due to irregular follow-up and incoherent feedback to the questionnaire. In total, the responses of 60 pediatricians were collected, and statistical analysis was performed with SPSS version 20. **Results:** The in-depth analysis of the data collected through questionnaires permits the deepening of understanding of the impact of administrative and clinical perspectives of telehealth among physicians. The study declared that telehealth has both advantages and disadvantages that need careful optimization for hassle-free implementation. This need requires support from government bodies, the public, and pediatric health care professionals. **Conclusion:** This study highlighted the relevant contribution of telehealth dynamics at every stage of implementation. Through careful optimization, telehealth can overcome the prevailing barriers and could effectively serve remote patients, thereby increasing the satisfaction level of pediatricians during pandemics.

Keywords: Telehealth; pediatrician; pandemic; remote healthcare service; healthcare sector.

RESUMEN

Investigación sobre las actitudes y experiencias de los pediatras respecto al uso de la telesalud durante la pandemia de COVID-19

Objetivos: Ante la creciente popularidad del sistema de telemedicina, este estudio exploró la influencia de la efectividad del tratamiento y sus características organizativas en la adopción de la telesalud entre los profesionales de la salud pediátrica. La situación de pandemia urge la necesidad de realizar estudios de este tipo para identificar planes de adopción de sistemas de telesalud. **Métodos:** Este artículo analizó diversos métodos de vanguardia y diseñó un cuestionario bien estructurado con preguntas técnicamente sólidas relacionadas con el objetivo del estudio. El trabajo contó con 90 participantes, de los cuales 30 fueron excluidos debido a un seguimiento irregular y a la incoherencia en la retroalimentación del cuestionario. En total, se recopilaron las respuestas de 60 pediatras y el análisis estadístico se realizó con

el programa SPSS versión 20. **Resultados:** El análisis exhaustivo de los datos recopilados mediante cuestionarios permite comprender mejor el impacto de las perspectivas administrativas y clínicas de la tele-salud entre los médicos. El estudio declaró que la tele-salud presenta ventajas y desventajas que requieren una optimización cuidadosa para una implementación sin complicaciones. Esta necesidad requiere el apoyo de los organismos gubernamentales, el público y los profesionales de la salud pediátrica. **Conclusión:** Este estudio destacó la importante contribución de la dinámica de la tele-salud en cada etapa de la implementación. Mediante una optimización cuidadosa, la tele-salud puede superar las barreras existentes y atender eficazmente a los pacientes remotos, aumentando así el nivel de satisfacción de los pediatras durante las pandemias.

Palabras clave: Telesalud; pediatra; pandemia; servicio de atención médica a distancia; sector sanitario.

RESUMO

Investigação das atitudes e experiências de pediatras em relação ao uso da telessaúde durante esta era de pandemia (COVID-19)

Objetivos: Motivado pela crescente popularidade do sistema de telemedicina, este estudo explorou a influência da eficácia do tratamento e suas características organizacionais na adoção da telessaúde entre profissionais de saúde pediátrica. A situação da pandemia exige a realização de tais estudos para revelar planos para a adoção de sistemas de telessaúde. **Métodos:** Este artigo analisou vários métodos de última geração e elaborou um questionário bem estruturado compreendendo perguntas tecnicamente fortes relacionadas ao objetivo do estudo. O trabalho envolveu 90 participantes, dos quais 30 foram excluídos devido ao acompanhamento irregular e feedback incoerente ao questionário. No total, as respostas de 60 pediatras foram coletadas, e a análise estatística foi realizada com o SPSS versão 20. **Resultados:** A análise aprofundada dos dados coletados por meio de questionários permite o aprofundamento da compreensão do impacto das perspectivas administrativas e clínicas da telessaúde entre os médicos. O estudo declarou que a telessaúde tem vantagens e desvantagens que precisam de otimização cuidadosa para implementação sem complicações. Essa necessidade requer suporte de órgãos governamentais, do público e de profissionais de saúde pediátrica. **Conclusão:** Este estudo destacou a contribuição relevante da dinâmica da telessaúde em todos os estágios da implementação. Por meio de otimização cuidadosa, a telessaúde pode superar as barreiras preexistentes e pode atender efetivamente pacientes remotos, aumentando assim o nível de satisfação dos pediatras durante pandemias.

Palavras-chave: Telessaúde; pediatra; pandemia; serviço de saúde remoto; setor de saúde.

1. INTRODUCTION

Telehealth is widely described as the prompt utilization of electronic information and communication systems for providing and supporting the health care sector while maintaining distance. Here, the techniques are the internet, videoconferencing, streaming media, store and forward imaging, and terrestrial and wireless communications [1]. Due to the COVID-19 pandemic in 2020, physician access to telehealth increased, which led to great attributes in telehealth, such as development in technology, changes in association, and health care delivery. This advancement in telehealth leads to cost-friendliness, better health outcomes, and improved inpatient care entry [2]. The possibilities of telehealth for patient access in medical care are strong in rural regions but are lacking in other areas [3].

Pediatricians are very concerned about children due to the need to obtain increasingly complex medicine and chronic diseases [4]. This turns into higher demand for subspecialty

pediatric care; however, the present wellness programme does not provide proper timely receipt or arrange subspecialty care [5]. Almost one-quarter of children experience difficulty in subspecialty care needs [6]. Even though parents and providers support communication with subspecialists, facilities remains poor [7]. Additionally, half of the common pediatricians hesitate to report difficulty with subspecialists [8]. Children from poor and remote communities face additional obstacles in obtaining care from the best pediatric subspecialty centers, mainly due to large distances and decreased awareness [9]. There are many possibilities for pediatricians in telehealth, such as education, practice, research, quality control, and consultation. Telehealth serves as higher quality in pediatric care and suggests reducing the pediatrician's work barriers by giving proper telehealth to patients [9].

In recent days, frameworks and techniques in telehealth requirements for patient care have increased, and few studies have given national estimates on the common usage of telehealth among physicians [10]. Some barriers faced in telehealth usage are lack of reimbursement, potential liability issues, lack of training, and cost of equipment, which leads to telehealth usage remaining low among physicians [11]. Similarly, another study also dealt with the estimation of barriers associated with pediatric telehealth services, such as strict state regulatory activities, low payment, and the absence of physical examination [12].

With the appearance of the SARS-CoV-2 pandemic, the Indian government initiated various steps to control the disease spread, transforming a few hospitals into COVID-19 wards, and many regular hospitals were shut down with outpatient division and operation theatres except for emergency services. Patients faced many struggles for adequate care during hospital visits, especially during a pandemic. To overcome the obstacles, the government provided proper guidelines for the practice of telemedicine to avoid the lack of healthcare services for the public. Telemedicine means delivering the service of health care, and the critical factor of distance will break through the help of communication technology. It serves as a reason for exchanging valid knowledge on diagnosis, preventing and receiving treatment for the injury of disease, and avoiding overcrowding in hospitals, particularly during pandemics [13]. Telemedicine can be divided into communication modes such as text-based and audio or video. The service model has been selected by the corresponding medical practitioner depending on the availability of technology. Telemedicine measures deal with screening of diseases, health care management, teleproctoring, and disaster management. Telemedicine is extensively used in the dermatology and pathology fields. Other branches, such as pediatrics, possess minimal services that need appropriate awareness of its vast utilization. The major aim of telemedicine is to provide equal service for all, with optimal safety to both physicians and patients, cost-effectiveness, and fast care on time. Meanwhile, children who are in high-risk communities need elaborate medical assistance during an emergency through telemedicine services.

1.1. Objectives

To perform data collection and statistical analysis of the information collected from pediatric professionals on the adoption of a telehealth system. To reveal the perspectives and attitudes of pediatric professionals on the adoption of telehealth during a pandemic.

2. METHODS

2.1. Study Design: A cross-sectional descriptive study

2.2. Sampling method: Purposive sampling

2.3. Data collection: Ninety pediatricians from government, private and public sectors were approached, and 30 participants were excluded due to incomplete follow-up. Hence, 60 respondents were finally engaged in the analysis during pandemic. A well-structured questionnaire with technically strong questions was used, and a 5-point scale was utilized to grade the answers. The questions related to the contribution of telemedicine inpatient recovery, cost-effectiveness, barriers, optimization possibilities, and hygienic characteristics were correlated to provide deep insights into the objectives. Validity denotes the degree to which the instrument explores the precise information by the objective. Our study analyzed the state-of-the-art methods and developed a well-structured questionnaire with appropriate cross-checking by field experts.

2.4. Statistical Analysis: Descriptive inferential statistics were utilized for the determination of the correlation coefficient, and consequently, the detection of associations with the demographic and predictor variables was also performed. Several factors were noted in the Excel sheets, and a comparative analysis was performed with statistical analysis. Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0. The range of values was estimated, and the correlation coefficient was also determined with every set of values. The demographic physical parameters of age and other factors are presented as counts and percentages using frequency analysis. ANOVA (analysis of variance) is a test used to test the difference among the groups. If the p value is smaller than 0.05, then it is shown that respondents differ in this study. One-way ANOVA was used to assess the differences between the investigated parameters in the different physical parameter groups. The study represents regression analysis and is presented in a table for the depiction of the interrelation of all the parameters for the determination of their corresponding value.

2.5. Compliance with ethical standards and consent: All the participants provided informed consent after the nature of the study was explained. The present study was approved by the Institutional Human Ethics Committee, -----on-----. Confidentiality was maintained throughout the study. Wherever necessary, the relevant information was cross-checked to maintain originality. Details about the respondents were kept in a password-protected computer, which was accessed only by the principal investigator.

3. RESULTS

3.1. Demographic analysis

Figure 1a represents the age based distribution of the investigated population, in which 40% of the pediatricians belonged to the age group of 25 to 35, 26.67% of the population belonged to the age range of 36 to 45, and 33.33% of the population belonged to the age range of 46 to 55. This states that the study included the perspectives of all the participants irrespective of age.

Figure 1b illustrates the gender based analysis of the study in which female pediatricians were observed to be less involved (33.33%), and consequently, male respondents were found

to be 66.67% in the present study. Similarly, Figure 1c denotes the service location of the respondents, where most of the pediatricians (73.33%) were providing services in urban areas, 13.33% were in rural areas, and the remaining 13.33% were in both sectors. This remains one of the limitations of the study, as it lacks equal urban and rural populations.

Meanwhile, Figure 1d shows that nearly half of the respondents (46.67%) were servicing in an autonomous body, 20% in the public sector, and 33.33% in the private sector. These results revealed that the study involved participants belonging to all categorizations of the healthcare sector.

Figure 1e describes the working experience of the pediatrician, in which 53.33% of the population had been providing services for 1 to 10 years, 26.67% 11 to 20 years, and 20% of the respondents had been working for more than 20 years.

Figure 1f shows that 73.33% of the respondents had been providing telehealth services for less than six months, and 26.67% for more than six months.

Accordingly, Figure 1g depicts the mode of telehealth service among the investigated population. Nearly 46.67% of the population is engaged in tele- and video conferencing, 26.67% is associated with mere video conferencing, and 13.33% of the population has been observed to use the oral/telephonic and e-Sanjeevani OPD methods.

Similarly, Figure 1h provides the types of barriers to the pediatrician during the adoption of telehealth services, in which 33.33% reported the absence of physical examination, 20% of the pediatrician reported communication barriers, 26.67% reported the absence of clinical examination, and 6.667% reported each barrier. Figure 1i illustrates the advantage of the telehealth service from respondents. It was observed that 40% of the pediatricians felt advantaged about the prevention of infection, 26.67% were happy in serving remote patients without traveling, 20% of the population was satisfied with providing immediate and authorized primary care to the children, and 13.33% benefited in terms of time and cost-effectiveness.

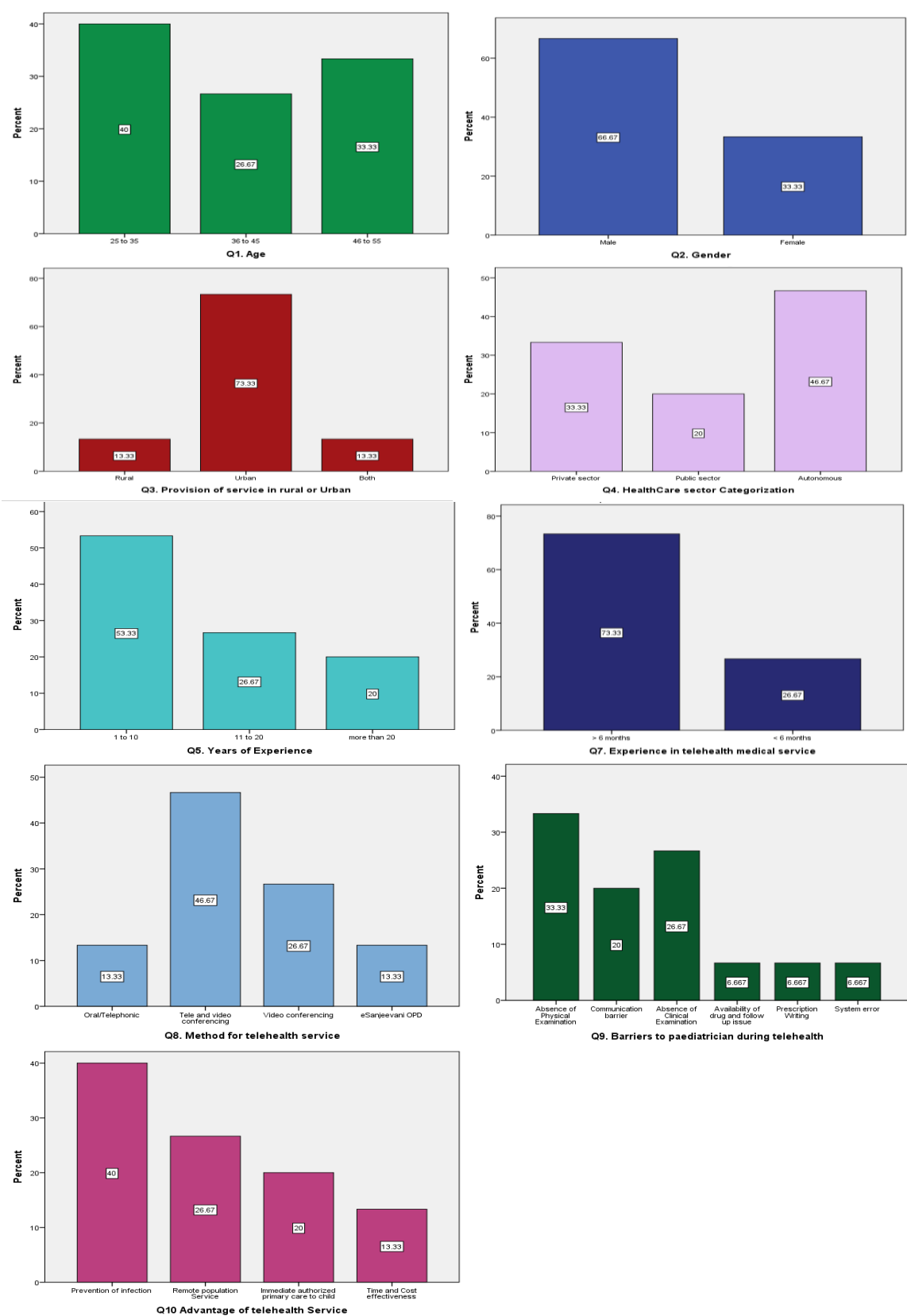


Figure 1. Demographic analysis

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) in obtaining a contribution to patient recovery.

Q11 Telehealth achieves contribution to patient recovery					
	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between groups	2.408	2	1.204	7.022	0.002
Within groups	9.775	57	0.171		
Total	12.183	59			

Table 1 defines that there exists a contribution to inpatient recovery using telehealth during the pandemic period. This is illustrated by the p value = 0.002, which is less than 0.05.

3.2. Post Hoc Tests

Table 2 depicts the post hoc analysis in which multiple comparisons of the dependent variable as telehealth achieves a contribution to patient recovery have been revealed. The Bonferroni's test obtained a significant value of 0.004. Hence, it is strongly proves that the respondents embrace the acceptability of the contribution of telehealth during a pandemic.

Table 2. Multiple comparisons

Dependent variable: Q11 Telehealth achieves a contribution to patient recovery Bonferroni				
(I) Q24 Tele health provides new opportunities	(J) Q24 Telehealth provides new opportunities	Mean difference (I-J)	Std. error	Sig.
Strongly agree	Agree	0.42500*	0.12859	0.004
	Neutral	0.00000	0.20207	1.000
Agree	Strongly agree	-0.42500*	0.12859	0.004
	Neutral	-0.42500	0.18130	0.068
Neutral	Strongly agree	0.00000	0.20207	1.000
	Agree	0.42500	0.18130	0.068

Table 3 denotes the significant relationship between the predictor variables, such as the physician's complexity in revealing patient information, telehealth implementation in the future, incorrect medicine intake, patient cooperation, medicine and material costs, hygiene, the possibility of new opportunities, and careful optimization for future benefits.

Table 3. ANOVA Analysis

		Sig.
Q18 Complexity in understanding patient's health	Between groups	0.001
	Within groups	
	Total	
Q20 No problem during implementing telehealth	Between groups	0.003
	Within groups	
	Total	
Q17 Theoretical examination from different viewpoints may to the intake of the wrong medicine	Between groups	0.026
	Within groups	
	Total	
Q16 Telehealth approaches are complicated and hard to implement in the pandemic situation	Between groups	0.000
	Within groups	
	Total	
Q15 The patients were very cooperative during treatment with the telehealth approach	Between groups	0.001
	Within groups	
	Total	
Q21 Reduced material and maintenance cost of hospital	Between groups	0.048
	Within groups	
	Total	
Q22 Access to extend	Between groups	0.034
	Within groups	
	Total	
Q23 Assurance of hygienic way for both physicians and patients thereby maintaining COVID 19 promises	Between groups	0.019
	Within groups	
	Total	
Q24 Tele health provides new opportunities	Between groups	0.025
	Within groups	
	Total	
Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future	Between groups	0.047
	Within groups	
	Total	

3.3. Nonparametric Correlations

Table 4 represents the correlation between experience in telehealth medical services and experience in telehealth medical services, and careful optimization can broaden the telehealth system in the future. Consequently, Table 5 shows that careful optimization can broaden the telehealth system in the future and overcome barriers to pediatricians during telehealth.

Table 4. Correlations

			Q7. Experience in telehealth medical service	Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future
Spearman's rho	Q7. Experience in telehealth medical service	Correlation coefficient	1.000	-0.148
		Sig. (2-tailed)	.	0.261
		N	60	60
	Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future	Correlation coefficient	-0.148	1.000
		Sig. (2-tailed)	0.261	.
		N	60	60

Table 5. Correlations 2

			Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future	Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth
Spearman's rho	Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future	Correlation coefficient	1.000	0.130
		Sig. (2-tailed)	.	0.324
		N	60	60
	Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Correlation coefficient	0.130	1.000
		Sig. (2-tailed)	0.324	.
		N	60	60

3.4. Cross tabulations

Tables 6 to 10 show the cross-tabulation analysis of the predictor variables of barriers to pediatricians during telehealth.

Table 6. Cross-tabulation of Barriers to the pediatrician during telehealth and Careful optimization can broaden the telehealth system in future

Count				
		Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future		
		Strongly agree	Agree	Neutral
Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Absence of Physical Examination	4	8	0
	Communication barrier	0	12	0
	Absence of Clinical Examination	4	4	4
	Availability of drugs and follow on the issue	4	0	0
	Prescription Writing	0	0	0
	System error	0	0	0
Total		12	24	4

Table 7. Barriers to the pediatrician during telehealth * Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future Cross tabulation

Count			
		Q25 Careful optimization can broaden the telehealth system in future	Total
		Disagree	
Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Absence of Physical Examination	8	20
	Communication barrier	0	12
	Absence of Clinical Examination	4	16
	Availability of drugs and follow on the issue	0	4
	Prescription Writing	4	4
	System error	4	4
Total		20	60

Table 8. Barriers to the pediatrician during telehealth * Q24 Telehealth provides new opportunities for Cross tabulation

Count				
		Q24 Telehealth provides new opportunities		
		Strongly agree	Agree	Neutral
Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Absence of physical examination	6	11	3
	Communication barrier	3	8	1
	Absence of clinical examination	3	13	0
	Availability of drugs and follow on the issue	2	0	2
	Prescription writing	0	4	0
	System error	0	4	0
Total		14	40	6

Table 9. Barriers to the pediatrician during telehealth and Telehealth provides new opportunities

Count		
		Total
Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Absence of physical examination	20
	Communication barrier	12
	Absence of clinical examination	16
	Availability of drugs and follow on the issue	4
	Prescription writing	4
	System error	4
Total		60

Table 10. Barriers to the pediatrician during telehealth and Q23 Assurance of hygienic way for both physicians and patients thereby maintaining COVID 19 promises

Count		Q23 Assurance of hygienic way for both physicians and patients thereby maintaining COVID 19 promises		Total
		Strongly agree	Agree	
Q9. Barriers to the pediatrician during telehealth	Absence of Physical Examination	12	8	20
	Communication barrier	4	8	12
	Absence of Clinical Examination	8	8	16
	Availability of drugs and follow on the issue	0	4	4
	Prescription Writing	0	4	4
	System error	4	0	4
Total		28	32	60

Table 11. Reliability statistics

Cronbach's Alpha	N of Items
0.817	27

3.5. Interpretation

The table illustrates the Cronbach's alpha value of reliability analysis. The determined alpha value is .817. This represents the highest rate of internal consistency for the reliability scale with definite sample.

4. DISCUSSION

Due to the COVID-19 pandemic, telehealth usage has greatly increased and played a vital role in the response. In India, some hospitals allow patients to access their care to avoid direct personal visits with physicians.

The extensive employment of telehealth systems remains unclear now, despite their existing favorable government supporting schemes, such as fast-tracked electronic prescribing associated with supported home delivery of the medicine. Whereas the input survey was collected on or before the breakout of financial blockades, to overcome the barriers faced by telehealth adoption, immediate action was taken regarding payment [14]. This serves as a motivation for more pediatricians and shows involvement in incorporating telehealth practice. Clinical reports mixed reviews of the transformation to virtual care during the COVID-19 pandemic. A study in April 2020 on primary health physicians found many telehealth uses, even though there remains dissatisfaction, including billing queries and a lack of cases. During this pandemic, an increased number of medical professionals and donors have adopted successful telehealth services to provide proper care to the investigated cases [15, 16]. If telehealth breaks its barriers and identifies its remedial measures, it will play a successful role postpandemic. Similarly, the current study also prove the significant contribution of telehealth for patient

recovery. In addition, the study discussed barriers of pediatrician during telehealth in various aspects.

Telehealth faces many drawbacks; for example, patients are not present on time, and here, physical testing is not applicable [10]. The restricted evaluation is only possible via inspection, which is lacking here due to the poor quality of video and video facilities. In particular, infants and toddlers face considerable difficulty in diagnosing the correct problem [17]. If the physician fails to diagnose the correct disease, it leads to an underestimation of the disease [18]. To avoid these kinds of problems, physicians should collect complete information about the issue in patients. We can also use electronic devices such as ultrasonography, electronic stethoscope, pulse oximeter, and electronic blood pressure apparatus by knowing the proper effectiveness and accuracy of those devices. Through rudimentary analysis, we encourage telehealth pediatricians and health workers to eliminate these challenges.

The pediatrician should have a very minimal level threshold for placing basic studies due to fewer investigation possibilities [19]. If there is no nearby hospital, telemedicine would be very helpful, and a pediatrician will provide guidance with proper first aid that will be life-saving for that patient until they reach the nearest hospital. Calculating dosage based on the age and weight of the children is important [20]. If the parameters are unknown, then prescriptions must be avoided. Particular medicines, such as psychotropic and narcotics drugs, are strictly restricted by telemedicine authorities and cannot be suggested to any chronic disease patients. Every prescription must have a specific format that may be checked at any time. Maintaining a proper record is mandatory for the first time. A screenshot record such as email text WhatsApp chats and video recording is also acceptable. To cover the liability of risk, documenting the report indication and calling back instructions is important.

Common symptom prescriptions will be easily cloned by frauds that lead to senseless drug users, who will face a vigorous penalty under stringent law [21]. For convenience, the practitioner can select their telemedicine. An important duty of a physician is to keep patients' privacy details secret and not share them with others. Patient pictures should be shared via safe means of communication. The physician–patient relationship will break if any fault occurs [22]. At any time, patient trust should not break, especially in risky situations. The government guidelines are not clear in addressing any blockade. If the practitioner is exempt, the patient data will be shared owing to technical issues. The same pay design that applies for inpatient appointments is appropriate here well. Telemedicine is most economical both for the patient and physicians to reduce the travel cost and stay. The Indian Academy of Telehealth recently announced an app for those members that can be utilized for telemedicine consultation and payment facilities.

The key person can contact the pediatrician, and the age group is not usually for the patients. The difficulty in physician–patient communication will be further clarified through telecommunication. Apart from this, patient knowledge and socioeconomic factors may face challenges when communicating through phone calls or video calls. Prescriptions through this method will lead to incorrect interpretation, neither by patients on their own nor by chemists, which end up in terrible results. The remedy is to obtain good quality internet speed, nonstop power supply, and workspaces on telecommunication, and chosen centers such as post offices, pharmacies, and PHC centers with good internet speed and training facilities such as ASHAs are also available. The staff must be trained in performing a video call and skilled in explaining prescriptions to patients. We must avoid giving telemedicine through phone calls but encouraged via video calls and give prescriptions in the standard format through email. We must

have a good liaison among tertiary care clinics and primary health centers, it had done with the Village source centers established by the Indian Space Research Organization.

If the physician even faces communication difficulty, he or she can document the problem and dismiss the conversation. A physician should become easy to use with the natural method by giving proper treatment, but in the present situation of the COVID-19 pandemic, a short-term change is necessary. As many healthcare specialists are affected, the physician–patient ratio will further decline. Telemedicine will be the only hopeful solution accessible. Moreover, the usage of telemedicine is high in India, and many problems regarding medical aspects may emerge, which may be considered by the medical community. Although attention is necessary for pediatricians, the benefits of telemedicine should be welcomed. We should discover the importance of the traditional way of performing medicine. These factors have to be analyzed, and careful optimization has to be structured to reveal the hassle-free implementation of telehealth among pediatricians.

4.1. Limitations

Like other survey and questionnaire-based research, the study has the following limitations. Initially, this analysis was observed to be based on the respondent's self-reports, and hence, there is a possibility of recall error or social desirability error. Then, the survey was limited to regional pediatricians and their own telehealth experiences, which influenced the results. The sample size was small and has to be optimized in future studies.

5. CONCLUSION

Telehealth is a multibeneficial tool connecting children to various aspects of health care providers. This technology might include live video, interactive online sessions, and specialized diagnostic tools. Additionally, it also allows caregivers and families to access healthcare facilities during times of emergency and pandemic situations. Meanwhile, pediatric professionals in developed cities can facilitate their service to children belonging to remote and small communities. However, the paper recommends strong and careful optimization to overcome various barriers associated with telehealth in a pediatric domain, such as cost, diagnostic bias, and understanding of the severity of the disease from acute to chronic conditions.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

There is no conflict of interest for any of the participants.

Author Contribution statement

SJ conceived and designed the study, conducted research, provided research materials, and collected and organized data. UPS analyzed and interpreted data. BNC wrote initial and final draft of article, and provided logistic support. All authors have critically reviewed and approved the final draft and are responsible for the content and similarity index of the manuscript.

Ethics approval

There is no Ethical Approval for this paper.

Data availability

There are no data available for this paper.

REFERENCES

1. A.C. Shah & S. M. Badawy. Telemedicine in pediatrics: systematic review of randomized controlled trials. *JMIR Pediatrics and Parenting*, **4**(1), e22696 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2196/22696>
2. J. Chuo, M.L. Macy & S.A. Lorch. Strategies for evaluating telehealth. *Pediatrics*, **146**(5), e20201781 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2020-1781>
3. A.G. Fiks, B.P. Jenssen & K.N. Ray. A defining moment for pediatric primary care telehealth. *JAMA Pediatrics*, **175**(1), 9–10 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.1881>
4. C.B. Foster, K.A. Martinez, C. Sabella, G.P. Weaver & M.B. Rothberg. Patient satisfaction and antibiotic prescribing for respiratory infections by telemedicine. *Pediatrics*, **144**(3), e20190844 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0844>
5. T. Lukenbill, C.B. San Giovanni, A. Simpson, M. Chew, W. Basco & J. Roberts. Assessing anthropometric and laboratory outcomes of a paediatric telehealth weight management program. *Journal of Telemedicine and Telecare*, **29**(5), 399–405 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1177/1357633X20986022>
6. A. Stephen. Implications for general pediatric care from pediatric telehealth approaches. *European Journal of Biomedical Informatics*, **17**(12), 90–91 (2021). URL: <https://www.ejbi.org/scholarly-articles/implications-for-general-pediatric-care-from-pediatric-telehealth-approaches.pdf>
7. B. Davies, P. Kenia, P. Nagakumar & A. Gupta. Paediatric and adolescent asthma: a narrative review of telemedicine and emerging technologies for the post-COVID-19 era. *Clinical & Experimental Allergy*, **51**(3), 393–401 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/cea.13836>
8. A. Darr, A. Senior, K. Argyriou, J. Limbrick, H. Nie, A. Kantczak, K. Stephenson, A. Parmar & J. Grainger. The impact of the coronavirus (COVID-19) pandemic on elective paediatric otolaryngology outpatient services—An analysis of virtual outpatient clinics in a tertiary referral centre using the modified paediatric otolaryngology telemedicine satisfaction survey (POTSS). *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, **138**, 110383, (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110383>
9. V.M. O'Hara, S.V. Johnston & N.T. Browne. The paediatric weight management office visit via telemedicine: pre-to post-COVID-19 pandemic. *Pediatric Obesity*, **15**(8), e12694 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1111/ijpo.12694>
10. M. Donati, S. Panicacci, A. Ruiu, S. Dalmiani, P. Festa, L. Ait-Ali, F. Mastorci, A. Pingitore, W. Pennè, L. Fanucci & S. Saponara. Exploiting biomedical sensors for a home monitoring system for paediatric patients with congenital heart disease. *Technologies*, **9**(3), 56 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/technologies9030056>
11. K. Sugand, C. Park, C. Morgan, R. Dyke, A. Aframian, A. Hulme, S. Evans & K.M. Sarraf. Impact of the COVID-19 pandemic on paediatric orthopaedic trauma workload in central London: a multi-centre longitudinal observational study over the “golden weeks” The COVid Emergency Related Trauma and orthopaedics (COVERT) Collaborative. *Acta Orthopaedica*, **91**(6), 633–638 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1080/17453674.2020.1807092>
12. A. J. Smith, B. F. Pfister, E. W. Woo, B. J. Walters, B. Blacket, N. Page & H. Drobetz. Safe and rapid implementation of telemedicine fracture clinics: the impact of the COVID-19 pandemic. *ANZ Journal of Surgery*, **90**(11), 2237–2241 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1111/ans.16339>

13. L. Tully, L. Case, N. Arthurs, J. Sorensen, J. P. Marcin & G. O'Malley. Barriers and facilitators for implementing paediatric telemedicine: Rapid review of user perspectives. *Frontiers in Pediatrics*, **9**, 630365 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fped.2021.630365>
14. K.N. Ray, L.E. Ashcraft, A. Mehrotra, E. Miller & J.M. Kahn. Family perspectives on telemedicine for pediatric subspecialty care. *Telemedicine and e-Health*, **23**(10), 852–862 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1089/tmj.2016.0236>
15. E. Strehle & N. Shabde. One hundred years of telemedicine: does this new technology have a place in paediatrics?. *Archives of Disease in Childhood*, **91**(12), 956–959 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1136/adc.2006.099622>
16. P. Biancone, S. Secinaro, R. Marseglia & D. Calandra. E-health for the future. Managerial perspectives using a multiple case study approach. *Technovation*, **120**, 102406 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2021.102406>
17. F. Nyame-Asiamah. Improving the 'manager-clinician' collaboration for effective healthcare ICT and telemedicine adoption processes – a cohered emergent perspective. *Information Technology for Development*, **26**(3), 525–550 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1080/02681102.2019.1650326>
18. R. E. Granberg, A. Heyer, P. R. Gehrman, P. W. Gunter, N. A. Hoff, A. Guth, M.S. Kayser, S. Kuna & R. Frasso. Patient and provider experiences with CBT-I administered in-person or via telemedicine: A randomized non-inferiority trial. *Cogent Psychology*, **9**(1), 2038936 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/23311908.2022.2038936>
19. N. Arthurs, L. Tully, G. O'Malley & S. Browne. Usability and engagement testing of mhealth apps in paediatric obesity: A narrative review of current literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **19**(3), 1453 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph19031453>
20. S. Esposito, E. Voccia, A. Cantarelli, A. Canali, N. Principi, A. Prati, *et al.* Telemedicine for management of paediatric infectious diseases during COVID-19 outbreak. *Journal of Clinical Virology*, **129**, 104522 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104522>
21. A. Chiumento, P. Baines, C. Redhead, S. Fovargue, H. Draper & L. Frith. Which ethical values underpin England's National Health Service reset of paediatric and maternity services following COVID-19: a rapid review. *BMJ Open*, **11**(6), e049214 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-049214>
22. J. Macwilliam, I. Hennessey & G. Cleary. Telemedicine: improving clinical care and medical education in paediatrics. *Paediatrics and Child Health*, **31**(10), 388–396 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.paed.2021.07.004>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

S. Jha, U.P. Sahu & B.N. Chaudhary. Investigation of the attitudes and experiences of pediatricians toward telehealth use during this pandemic (COVID-19) era. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 89–103 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117544>

Effect of caffeine consumption on the academic performance among students of University of Kalamoon (UOK)

Farah Bitar

Faculty of pharmacy, University of Kalamoon (UOK), Deratiah, Syria

E-mail: farah.bitar707@gmail.com

Tel: +963117833999, Fax: +963117833990

Received: August 1, 2024

Corrected: December 23, 2024

Accepted: December 29, 2024

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119552>

SUMMARY

Introduction: Caffeine is the most commonly used psychoactive substance throughout the world. It is found in coffee, tea, and chocolate, as it is produced naturally in the beans and leaves of the plants used to manufacture these products. Caffeine is often used for its benefits, which include increased vigilance. It does have side-effects, however, such as palpitations and withdrawal symptoms that include headache. **Objective:** This study aimed to determine the frequency of caffeine consumption and its effect on academic performance among students of the University of Kalamoon (UOK). **Methodology:** The study was conducted 550 undergraduate students from first to final year. **Results:** About 51.6% were females, 84.2% of the students scored less than 3 Grade Point Average (GPA). Majority of the students (98.9%) consume caffeine in any form such as an international Coffee's trademark (72.9%), tea and coffee. About 64.4% of the students consume caffeine at morning. About 51.3% of the students reported sleeplessness as a side effect and 32.9% of them reported headache as a withdrawal symptom. High proportions of the students were found to be consuming caffeine due to the misconception that caffeine (75.5%) increase their academic performance. **Conclusions:** This study found no significant association between academic performance and caffeine consumption.

Keywords: Academic performance; caffeine; grade point average (GPA); University of Kalamoon (UOK).

RESUMEN

Efecto del consumo de cafeína en el rendimiento académico de los estudiantes de la Universidad de Kalamoon (UDK)

Introducción: La cafeína es la sustancia psicoactiva más consumida en todo el mundo. Se encuentra en el café, el té y el chocolate, ya que se produce de forma natural en los granos y hojas de las plantas utilizadas para elaborar estos productos. La cafeína se utiliza a menudo por sus beneficios, que incluyen una mayor lucidez mental. Sin embargo, presenta efectos secundarios, como palpitaciones y síntomas de abstinencia, como dolor de cabeza. **Objetivo:** Este estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia del consumo de cafeína y su efecto en el rendimiento académico de los estudiantes de la Universidad de Kalamoon (UOK). **Metodología:** El estudio se realizó con 550 estudiantes de pregrado, desde el primero hasta el último año. **Resultados:** El 51,6 % eran mujeres y el 84,2 % de los estudiantes obtuvo un

promedio de calificaciones (GPA) inferior a 3. La mayoría de los estudiantes (98,9 %) consume cafeína en alguna forma, como alguna marca comercial internacional de café (72,9 %), té y café. Aproximadamente el 64,4 % de los estudiantes consumen cafeína por la mañana. El 51,3 % reportó insomnio como efecto secundario y el 32,9 % dolor de cabeza como síntoma de abstinencia. Se observó que un alto porcentaje de estudiantes consumía cafeína debido a la idea errónea de que esta aumenta su rendimiento académico (75,5 %). **Conclusiones:** Este estudio no encontró una asociación significativa entre el rendimiento académico y el consumo de cafeína.

Palabras clave: Rendimiento académico; cafeína; promedio de calificaciones (GPA); Universidad de Kalamoon (UDK).

RESUMO

Efeito do consumo de cafeína no desempenho acadêmico entre alunos da Universidade de Kalamoon (UDK)

Introdução: A cafeína é a substância psicoativa mais comumente usada em todo o mundo. É encontrada no café, chá e chocolate, pois é produzida naturalmente nos grãos e folhas das plantas usadas para fabricar esses produtos. A cafeína é frequentemente usada por seus benefícios, que incluem maior vigília. No entanto, ela tem efeitos colaterais, como palpitações e sintomas de abstinência, que incluem dor de cabeça. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar a frequência do consumo de cafeína e seu efeito no desempenho acadêmico entre alunos da Universidade de Kalamoon (UOK). **Metodologia:** O estudo foi conduzido com 550 alunos de graduação do primeiro ao último ano. **Resultados:** Cerca de 51,6% eram mulheres, 84,2% dos alunos pontuaram menos de 3 na média de notas (GPA). A maioria dos alunos (98,9%) consome cafeína em qualquer forma, como alguma marca comercial internacional de café (72,9%), chá e café. Cerca de 64,4% dos alunos consomem cafeína pela manhã. Cerca de 51,3% dos alunos relataram insônia como efeito colateral e 32,9% deles relataram dor de cabeça como sintoma de abstinência. Altas proporções de alunos consumiam cafeína devido ao equívoco de que a cafeína (75,5%) aumentava seu desempenho acadêmico. **Conclusões:** Este estudo não encontrou associação significativa entre desempenho acadêmico e consumo de cafeína.

Palavras-chave: Desempenho acadêmico; cafeína; média de notas (GPA); Universidade de Kalamoon (UDK).

1. INTRODUCTION

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a psychostimulant purine-like alkaloid, which is found naturally in coffee, tea, cacao beans (source for chocolate and cocoa) guarana, mate, and kola nuts, though it has been identified in more than 60 plant species [1, 2]. Nowadays, caffeine is the most widely consumed psychostimulant in the world. It is estimated that caffeine is being consumed by more than 80% [1, 3]. The caffeine quantity reported was (± 137 mg/cup of caffeinated coffee and ± 2 mg/cup of decaffeinated coffee; the volume of one cup is approximately 240 ml), tea (± 47 mg/cup), caffeinated soft drinks (± 46 mg/340 ml can or bottle of cola beverage), energy drinks (up to 80 mg/can) and caffeinated chocolates, non-beverage foodstuff, medications (± 7 mg/200 g) [4, 5].

The reason behind caffeine consumption reported was increased self-reported alertness, improved performance, vigilance in performing tasks, concentration, improved long-term memory and faster locomotors speed [6, 7].

While caffeine is generally thought to be safe in moderate amounts (i.e., ≤ 400 mg per day) in healthy adults [8], it is clearly not an innocuous compound and can cause significant toxicity

and even lethality (i.e., most commonly via myocardial infarction or arrhythmias) if sufficient quantities are consumed [8, 9].

With regard to the effects of dosage, caffeine doses from 12.5 mg to 20 times this amount affect performance in terms of vigilance and related tasks to a similar extent, indicating a very flat dose–response relationship. Thus, increasing the dosage does not necessarily strengthen the positive effects of caffeine [10]. Low to moderate doses of caffeine (20–200 mg) reportedly produce increased well-being, happiness, energy, alertness, and sociability, whereas higher doses are more likely to produce anxiety, irritability and gastric discomfort [11].

Excessive ingestion (1000–1500 mg per day) leads to a state of intoxication known as caffeinism, which is characterized by restlessness, agitation, excitement, incoherent and excited thoughts and speech, and insomnia. Caffeinism is often overlooked by doctors during psychiatric assessments as these symptoms are similar to many psychiatric disorders [12]. Although the modest acute effects may occur following initial use, tolerance to these effects appears to develop in the context of habitual use of the substance, with the occurrence of withdrawal symptoms after periods of abstinence [5].

Typically, the onset of withdrawal symptoms occurs 12 to 24 hours after abstinence, with peak intensity at 20 to 51 hours. Withdrawal symptoms, including headaches, fatigue, decreased energy/physical activity, decreased alertness, drowsiness, decreased contentedness, depressed mood, difficulty in concentrating, irritability and clouded mentality, have been reported, and may last for two to nine days [11, 12].

The aim of the study was to determine (i) the use of caffeine for academic and other purposes, (ii) which caffeinated products were mostly used, (iii) the frequency of caffeine use for academic purposes, and (iv) knowledge of its benefits, side-effects and withdrawal symptoms among students of University of Kalamoon (UOK). Knowledge of common facts and misconceptions regarding the effects of caffeine in the target population were also investigated.

1.1. The specific contribution of the research:

Since caffeine consumption is very widespread especially among university students; and it causes toxicity if it is consumed in large quantities, and due to the misconception that caffeine increases academic performance, in addition to the fact that the global studies on this subject are limited and due to the lack of a prior study in Syria on this matter, therefore the aim of this research is to find out if there is a significant association between caffeine consumption academic performance or not by performing a cross-sectional study on 550 students of UOK population and analyzing data by using SPSS program. This study found no significant association between academic performance and caffeine consumption.

2. METHODOLOGY

A cross-sectional study was carried out on 550 students of UOK population that included all first to final year students. After an introductory presentation informing students about the rationale and implementation of the study, data were collected by means of a questionnaire available in Arabic. Participants were given the opportunity to ask questions on matters unclear to them. In addition to demographic details, information regarding different types of caffeinated products and frequency of consumption, the questionnaire included multiple-choice questions on the benefits, side-effects and withdrawal symptoms of caffeine. All participants received a consent form and information document with the questionnaire. Participation was voluntary. The signed consent forms and questionnaires were handed in separately.

Academic performance was assessed through latest GPA (Grade Point Average) of the study participants. GPA less than 3.0 was considered as below average academic performance and GPA more than 3.0 was labelled as above average academic performance. The data were entered and analyzed by using SPSS program. Frequency and percentages were calculated and multivariate analysis was performed for determining the association of caffeine consumption and academic performance.

3. RESULTS

About 51.6% of the students were females and 48.4% were males. About 15.8% of the students scored less than 3 GPA and 84.2% scored more than 3 GPA. Majority (98.1%) of the students consumed caffeine in any form and only 1.1% of the students did not consume caffeine in any form (Table 1).

Table 1. Socio-demographic characteristics of the study participants N=550.

Characteristics	Percentage (%)
Gender	
Male	48.4
Female	51.6
GPA	
0-1	2-4
1-2	14
2-3	67.8
3-4	15.8
Consume caffeine in any form	
Yes	98.9
No	1.1

About 72.9% of the students consumed caffeine in form of international Coffee's trademark, 59.9% tea, 57.9% coffee, 42.5% cola and 22.6% in energy drinks form (Table 2).

Table 2. Frequency distribution of consumption of caffeine containing items by the study participants.

Caffeine containing items	Percentage (%)
Consume international Coffee's trademark	
Yes	72.9
No	27.1
Consume coffee	
Yes	57.9
No	42.1
Consume tea	
Yes	59.9
No	40.1
Consume cola	
Yes	42.5
No	57.5
Consume energy drinks	
Yes	22.6
No	77.4

About 64.4% of students consume caffeine at morning, 42.9% at the time of studying, 31.2% at evening and 27.3% at middle of the day (Table 3).

Table 3. Frequency distribution of caffeine consumption time by the study participants.

Time	Percentage (%)
Morning	
Yes	64.4
No	35.6
Middle of the day	
Yes	27.3
No	72.7
Evening	
Yes	31.2
No	68.8
Time of the studying	
Yes	42.9
No	57.1

Regarding perception about caffeine consumption 75.5% reported that it increases academic performance, 48.2% reported that caffeine containing drinks have a favorite flavor, 46% reported that it increases alertness, 42.7% reported that it improves group work activity, 19.5% reported that it increases study hours, 12.4% reported that it reduces headache and 11.7% reported that it reduces fatigue (Table 4).

Table 4. Distribution of variables regarding perceptions of students about caffeine consumption.

Variables	Percentage (%)
Caffeine consumption increases academic performance	
Yes	75.5
No	24.5
Caffeine consumption increases alertness	
Yes	46
No	54
Caffeine consumption increases study hours	
Yes	19.5
No	80.5
Caffeine consumption reduces fatigue	
Yes	11.7
No	88.3
Caffeine consumption reduces headache	
Yes	12.4
No	87.6
Caffeine consumption improves group work activity	
Yes	42.7
No	57.3
Caffeine containing beverages have a favorite flavor	
Yes	48.2
No	51.8

Regarding side effects resulted from increasing consumption of caffeine 51.3% reported that it causes sleeplessness, 26.5% reported that it causes tremors, 24.5% reported that it causes tachyarrhythmias, 21.1% reported that it induces peptic ulcers, 8.5% reported that it causes dizziness and 5.6% reported that it causes convulsions (Table 5).

Table 5. Frequency distribution of side effects of caffeine consumption by the study participants.

Side effect	Percentage (%)
Sleeplessness	
Yes	51.3
No	48.7
Tachyarrhythmias	
Yes	24.5
No	75.5
Tremors	
Yes	26.5
No	73.5
Dizziness	
Yes	8.5
No	91.5
Convulsions	
Yes	5.6
No	49.4
Peptic Ulcer	
Yes	21.1
No	78.9

Regarding withdrawal symptoms caused after periods of caffeine consumption abstinence 32.9% reported that it causes headache, 27.8% reported that it causes difficulty in concentrating, 21.6% reported that it decreases alertness, 19.5% reported that it causes anxiety and 14.9% reported that it causes fatigue (Table 6).

Table 6. Frequency distribution of withdrawal symptoms of caffeine consumption abstinence by the study participants.

Withdrawal symptom	Percentage (%)
Headache	
Yes	32.9
No	67.1
Decreased alertness	
Yes	21.6
No	78.6
Increased anxiety	
Yes	19.5
No	80.5
Difficulty in concentrating	
Yes	27.8
No	72.2
Fatigue	
Yes	14.9
No	85.1

The data were analyzed by using SPSS program. According to Spearman's rho test caffeine consumption did not show any significant association with academic performance (GPA) (Table 7).

Table 7. Characteristics of socio-demographics, caffeine containing substances consumption and Grade Point Average (GPA).

Correlations			
	GPA		
Spearman's rho	Number of Coffee's trade-mark cups consumed per day	Correlation Coefficient (r)	-0.050
		Sig. (2-tailed) (P-value)	0.240
		N	550
	Number of coffee cups consumed per day	Correlation Coefficient (r)	0.011
		Sig. (2-tailed) (P-value)	0.803
		N	549
	Number of tea cups consumed per day	Correlation Coefficient (r)	0.023
		Sig. (2-tailed) (P-value)	0.585
		N	550
	Number of cola boxes consumed per day	Correlation Coefficient (r)	-0.105*
		Sig. (2-tailed) (P-value)	0.013
		N	550
	Number of energy drinks boxes consumed per day	Correlation Coefficient (r)	-0.135**
		Sig. (2-tailed) (P-value)	0.002
		N	549
	GPA	Correlation Coefficient (r)	1.000
		Sig. (2-tailed) (P-value)	
		N	550
**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)			
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)			

4. DISCUSSION

Caffeine is the most widely consumed psychoactive substance worldwide. Coffee, tea, Coffee's trademark and some soft drinks are popular nutritional sources of caffeine. This study was carried out on 550 students of UOK population that included all first to final year students.

This study majority reported that the majority of the participants consume caffeine in different forms (coffee, Coffee's trademark, tea, cola and energy drinks) especially in morning. The most popular caffeinated beverage among students was Coffee's trademark followed by tea and coffee respectively. And the major side-effect of consuming caffeine was sleeplessness.

This study demonstrates that majority of the participating students self-perceive that caffeinated beverages improve the academic performance.

There found no significant relation between the number of Coffee's trademark cups consumed per day and the cumulative GPA of the students with ($r=-0.050$, $N=550$, P-value of 0.240) where P-value is > 0.05 . There found no significant relation between the number of coffee cups consumed per day and the cumulative GPA of the students with ($r=0.011$, $N=549$, P-value of 0.803) where P-value is > 0.05 . There found no significant relation between the number of tea cups consumed per day and the cumulative GPA of the students with ($r=0.023$, $N=550$, P-value of 0.585) where P-value is > 0.05 . Although P-value is < 0.05 , there found no significant relation between the number of cola boxes consumed per day and the cumulative GPA of the students with ($r=-0.105$, $N=550$, P-value of 0.013) because correlation coefficient is negative. Although P-value is < 0.05 , there found no significant relation between the number of energy drinks boxes consumed per day and the cumulative GPA of the students with ($r=-0.135$, $N=549$, P-value of

0.002) because correlation coefficient is negative. However, no association was found between caffeine consumption and academic performance.

5. CONCLUSIONS

This study concluded that high proportions of the students were consuming caffeine due to the misconception that caffeine increases academic performance. This study found no significant association between academic performance and caffeine consumption. It is recommended that students should adopt healthy life style and use caffeine in moderation. The false perception that caffeine improves academic performance should be corrected by frequent health awareness sessions and seminars. Most of the participants were consuming caffeine without having sufficient knowledge of its benefits, side-effects and withdrawal symptoms. It is recommended that awareness programs on the side-effects and symptoms of caffeine withdrawal should be carried out.

The possible side effects that the study population might exposed to:

Sleeplessness was the main side effect that appeared on about the half of the study population, while the frequency of occurrence of tachyarrhythmias, tremors and peptic ulcer were less, whereas convulsions and dizziness were the lowest.

CONFLICTS OF INTEREST

Author has no conflict of interest.

REFERENCES

1. M.A. Heckman, J. Weil & E. Gonzalez de Mejia. Caffeine (1, 3, 7- trimethyl xanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science*, **75**(3), R77–87 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x>
2. C.D. Frary, R.K. Johnson & M.Q. Wang. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, **105**(1), 110–113 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.10.027>
3. J.J. Barone & H.R. Roberts. Caffeine consumption. *Food and Chemical Toxicology*, **34**(1), 119–129 (1996). Doi: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00093-3](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00093-3)
4. J.E. James. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosomatic Medicine*, **66**(1), 63–71 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1097/10.psy.0000107884.78247.f9>
5. J.E. James & P.J. Rogers. Effects of caffeine on performance and mood: withdrawal reversal is the most plausible explanation. *Psychopharmacology* (Berl), **182**(1), 1–8 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0084-6> . Epub 2005 Jul 2
6. G. Christopher, D. Sutherland & A. Smith. Effects of caffeine in non-withdrawal volunteers. *Human Psychopharmacology*, **20**(1), 47–53 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1002/hup.658>
7. P.A.H.M. Hameleers, M.P.J. Van Boxtel, E. Hogervorst, W.J. Riedel, P.J. Houx, F. Buntinx & J. Jolles. Habitual caffeine consumption and its relation to memory, attention, planning capacity and psychomotor performance across multiple age groups. *Human Psychopharmacology*, **15**(8), 573–581 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1002/hup.218>
8. P. Nawrot, S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz & M. Feeley. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*, **20**(1), 1–30 (2003). Doi: <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>

9. A.W. Jones. Review of caffeine-related fatalities along with postmortem blood concentrations in 51 poisoning deaths. *Journal of Analytical Toxicology*. **41**(3), 167–172 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkx011>
10. S.V. Heatherley, R.C. Hayward, H.E. Seers & P.J. Rogers. Cognitive and psychomotor performance, mood, and pressor effects of caffeine after 4, 6, 8 h caffeine abstinence. *Psychopharmacology (Berl)*, **178**(4), 461–470 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2159-9>
11. L.M. Juliano & R.R. Griffiths. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology (Berl)*, **176**(1), 1–29 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2000-x>
12. A.P. Winston, E. Hardwick & N. Jabri. Neuropsychiatric effects of caffeine, *Advances in Psychiatric Treatment*, **11**(6), 432–439 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1192/apt.11.6.432>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

F. Bitar. Effect of caffeine consumption on the academic performance among students of University of Kalamoon (UOK). *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 104–112 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119552>

Microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio

Ana Karina Albuja Landi ¹, Paola Arguello-Hernández ², Sandra Escobar Arrieta ¹, Verónica Cando Brito ¹, Judith Araque ³ & Félix Andueza ^{3,4,5*}

¹Grupo de Investigación LEISHPAREC, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Campus universitario, Carretera Panamericana. Riobamba, Ecuador.

²Grupo de Investigación IDEA, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Campus universitario, Carretera Panamericana, Riobamba, Ecuador.

³Grupo de investigación ACMME. Universidad Central del Ecuador, Campus Universitario, Avenida Universidad. Quito. Ecuador.

⁴Doctorado en Química de Medicamentos, mención Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Sector Campo de oro, Mérida, Venezuela.

⁵Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. C. de José Antonio Novais, 12, Moncloa, Madrid. España.

*Correos electrónicos: anduezalealfelix@gmail.com, fdandueza@uce.edu.ec

Recibido: 21 de abril de 2024

Corregido: 3 de enero de 2025

Aceptado: 6 de enero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.114032>

RESUMEN

Introducción: Conocer la microbiota bacteriana presente en la leche cruda bovina es importante para determinar su inocuidad y los posibles usos en la producción de derivados lácteos. **Objetivo:** Identificar la biodiversidad de la microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio en Ecuador. **Métodos:** Se utilizó la secuenciación de próxima generación (NGS) Illumina MiSeq de la región hipervariable V3 y V4 del gen 16S rRNA para identificar la composición taxonómica bacteriana de la leche analizada. El estudio se desarrolló durante los meses de invierno y de verano en la Provincia de Tungurahua, Ecuador y las muestras se recolectaron en un centro de acopio. El análisis comparativo de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa ClustalW y BLAST, obteniéndose los filotipos asignados a nivel de familia, género y especies. **Resultados:** Los datos obtenidos indican un predominio de bacterias Gram positivas (Terrabacterias) pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas (Firmicutes), destacando la presencia mayoritaria, tanto en invierno como en verano, de las especies *Lactococcus raffinolactis* (42,3% y 22,81%) y *Lactococcus lactis* (37,4% y 52,25%). La biodiversidad y riqueza de especies fue mayor en la época de invierno, aunque el número de bacterias fue mayor en la época verano. También se identificaron microorganismos patógenos, aunque en porcentajes bajos, de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. **Conclusiones:** Los hallazgos de la investigación pueden ayudar a formular estrategias para la elaboración de derivados lácteos de buena calidad y establecer denominaciones de origen que potencien su comercialización.

Palabras clave: Microbiota; bacterias; leche; biodiversidad; Ecuador.

SUMMARY

Bacterial microbiota of raw bovine milk stored in a collection center

Introduction: Knowing the bacterial microbiota present in raw bovine milk is important to determine its safety and possible uses in the production of dairy products. **Objective:** Identify the biodiversity of the bacterial microbiota of raw bovine milk stored in a collection center in Ecuador. **Methods:** Illumina MiSeq next-generation sequencing (NGS) of the V3 and V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was used to identify the bacterial taxonomic composition of the analyzed milk. The study was carried out during the winter and summer months in the Province of Tungurahua, Ecuador and the samples were collected in a collection center. The comparative analysis of the sequences obtained was carried out using the ClustalW and BLAST programs, obtaining the phylotypes assigned at the family, genus, and species level. **Results:** The data obtained indicate a predominance of Gram positive bacteria (Terrabacteria) belonging to the group of lactic acid bacteria (Firmicutes), highlighting the majority presence, both in winter and summer, of the species *Lactococcus raffinolactis* (42.3% and 22.81%) and *Lactococcus lactis* (37.4% and 52.25%). Biodiversity and species richness were greater in the winter season, although the number of bacteria was greater in the summer season. Pathogenic microorganisms were also identified, although in low percentages, of the genera *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*. **Conclusions:** The research findings can help formulate strategies for the production of good quality dairy products and establish designations of origin that enhance their commercialization.

Keywords: Microbiota; bacteria; milk; biodiversity; Ecuador.

RESUMO

Microbiota bacteriana do leite bovino cru armazenado em um centro de coleta

Introdução: Conhecer a microbiota bacteriana presente no leite bovino cru é importante para determinar sua segurança e possíveis utilizações na produção de produtos lácteos. **Objetivo:** Identificar a biodiversidade da microbiota bacteriana do leite bovino cru armazenado em um centro de coleta no Equador. **Métodos:** O sequenciamento de próxima geração (NGS) Illumina MiSeq da região hipervariável V3 e V4 do gene 16S rRNA foi utilizado para identificar a composição taxonômica bacteriana do leite analisado. O estudo foi realizado durante os meses de inverno e verão na província de Tungurahua, Equador e as amostras foram coletadas em um centro de coleta. A análise comparativa das sequências obtidas foi realizada através dos programas ClustalW e BLAST, obtendo-se os filotipos atribuídos em nível de família, gênero e espécie. **Resultados:** Os dados obtidos indicam um predomínio de bactérias Gram positivas (Terrabacteria) pertencentes ao grupo das bactérias lácticas (Firmicutes), destacando-se a presença maioritária, tanto no inverno como no verão, da espécie *Lactococcus raffinolactis* (42,3% e 22,81 %) e *Lactococcus lactis* (37,4% e 52,25%). A biodiversidade e a riqueza de espécies foram maiores no inverno, embora o número de bactérias tenha sido maior no verão. Também foram identificados microrganismos patogênicos, embora em percentuais baixos, dos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. **Conclusões:** Os resultados da investigação podem ajudar a formular estratégias para a produção de produtos lácteos de boa qualidade e estabelecer denominações de origem que potenciem a sua comercialização.

Palavras-chave: Microbiota; bactérias; leite; biodiversidade; Equador.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota bacteriana de la leche cruda ha sido estudiada durante varias décadas debido a las relaciones entre su biodiversidad y las posibles enfermedades de origen alimentaria que puede traer su consumo [1-3]. De igual forma, se ha establecido desde hace años la influencia que tiene la composición de la población de bacterias con la calidad de los productos lácteos que de ella se pueden derivar [4, 5].

La microbiota bacteriana de la leche cruda de origen bovino puede contener bacterias procedentes del ambiente donde se encuentra el ganado, de los alimentos dispensados, de los utensilios utilizados para el ordeño, así como también de la ubre y piel de la vaca [6, 7]. La diversidad en la composición taxonómica de esta población bacteriana se ha relacionado también con los diferentes tipos de producción de la leche empleados por los ganaderos [6, 8].

Numerosos estudios se han publicado sobre la microbiota bacteriana presente en la leche cruda de origen bovino [6, 7, 9, 10], observándose la presencia de una gran diversidad de géneros y especies, algunas patógenas, causantes de diversos tipos de infecciones en el rebaño vacuno y de infecciones alimentarias en los humanos [1, 3], así como especies beneficiosas para la salud de los consumidores, dado a su propiedades como probióticos [11, 12]. Por otra parte, también se han detectado especies bacterianas con capacidades enzimáticas que le permiten diversas aplicaciones a nivel de la industria de los derivados lácteos [13, 14, 15].

En Ecuador, los estudios sobre la microbiota bacteriana de la leche cruda bovina se han relacionado con trabajos sobre los indicadores de calidad sanitaria, detección de bacterias patógenas e investigaciones sobre regulaciones sanitarias y económicas [16-21].

El empleo de las técnicas metagenómicas en los estudios de identificación de la biodiversidad bacteriana busca ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad de la microbiota de la leche cruda bovina, lo cual, utilizando las técnicas microbiológicas tradicionales de cultivo, aislamiento, cuantificación y caracterización, es limitado [6, 7, 10].

Con los estudios metagenómicos se puede determinar tanto los microorganismos cultivables como los viables no cultivables, recopilando nueva información sobre muchos taxones microbianos, inclusive de aquellos no conocidos hasta ahora [22, 23].

Al estudiar la microbiota bacteriana presente en la leche cruda almacenadas en un centro de acopio ubicado en la provincia de Tungurahua, se podrá establecer tanto la calidad microbiana de la leche, como la población bacteriana característica y su biodiversidad, lo cual servirá para poder tener en un futuro, denominaciones de origen en los productos lácteos que se producen en esa zona del país, además de detectar cepas bacterianas con potencial biotecnológico para su utilización en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, así como en la industria farmacéutica, ayudando al desarrollo tecnológico y económico de la zona y de Ecuador.

Este estudio pionero representa un avance fundamental en la comprensión de la composición microbiana y genética de la leche, abriendo puertas a la exploración detallada de la diversidad microbiológica presente en este vital recurso.

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención de muestras

Las muestras de leche cruda bovina analizadas en el estudio fueron recolectadas en el centro de acopio ubicado en el Cantón Mocha, perteneciente a la Provincia de Tungurahua, Ecuador (latitud de 1°25'10.3"S y una longitud de 78°39'12.5"W), en donde se almacena diariamente aproximadamente 2000 litros de leche, proveniente de 91 productores lecheros (Ver figura 1). Se analizaron en total 4 muestras compuestas de leche cruda (500 mL) provenientes de las rutas y los tanques de almacenamiento. Las muestras fueron recolectadas durante las épocas de invierno y verano de acuerdo con los datos de pluviosidad de la zona (verano: agosto y septiembre 2020; invierno: diciembre 2020 y enero 2021), siguiendo para ello los criterios indicados por la norma ecuatoriana para la recolección de muestras de alimentos, entre ellos la leche cruda, y manteniendo durante todo el proceso las medidas de higiene y asepsia adecuadas [24].

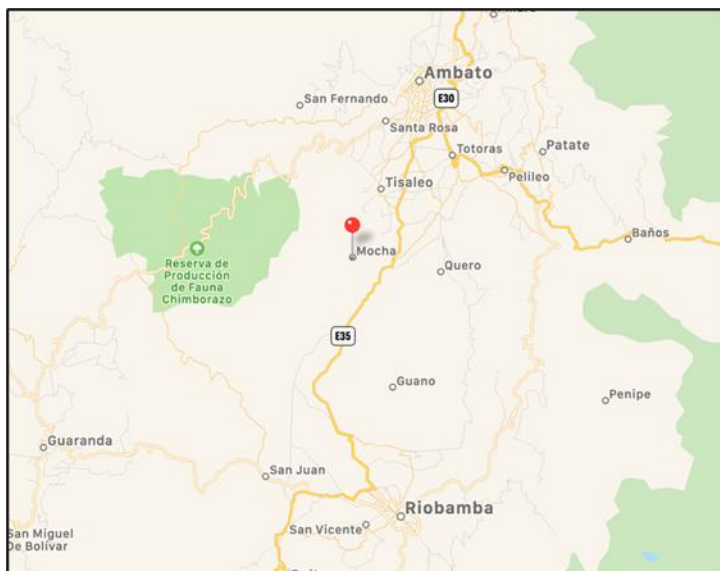


Figura 1. Mapa de ubicación del Cantón Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Fuente: <https://www.google.com/maps/place/Cantón+Mocha>

2.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico

Para estudiar la diversidad bacteriana de la leche cruda almacenada en el centro de acopio, se empleó el análisis de perfil taxonómico de los genes del ARN 16S de bacterias, mediante secuenciación masiva Next Generation Sequencing (NGS), a través del sistema de secuenciación MiSeq de Illumina. Para ello, cada muestra fue centrifugada a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante un tiempo de 10 minutos. Finalizado el tiempo de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se recolectó el pellet en un tubo ependorf y el mismo fue utilizado para el proceso de extracción de ADN genómico total mediante disrupción mecánica, utilizando mortero y pistilo, por un tiempo de 12 min. Seguidamente se realizó una lisis por método químico, utilizando el kit de extracción Fast DNA™ SPIN Kit for Soil, siguiendo las instrucciones del fabricante (MP Biomedicals, CA USA). El ADN genómico total obtenido luego del proceso de extracción fue diluido en agua ultra pura libre de nucleasas, y cuantificado usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 a una absorbancia a 260 y 280 nm (Thermo Fisher, USA).

2.3. Amplificación del gen bacteriano ARNr 16 S

La región amplificada fueron las regiones variables V3 y V4 de los genes del ARNr 16S bacterianos y las regiones conservadas que se encuentran entre ellas [25, 26]. En una primera etapa se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una mezcla de reacción de 50 µL que contenía 0,3 mg/mL de albúmina de suero bovino, 250 µM de mezcla de dinucleótidos (dTNP), 0,5 µM de cada uno de los primer V3 y V4 con los adaptadores para los índices Nextera Xt, 0,02 U de polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA polymerase. Thermo Scientific), 5 µL del ADN purificado y buffer HF 5X con 1,5 mM de MgCl₂ [27].

Las secuencias de los primer utilizados fueron:

1. Bakt_341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' [28]
2. Bakt_805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' [29]

Las condiciones para esta primera PCR fueron las siguientes: Inició a 98 °C durante 30 segundos, seguidos de 25 ciclos a 98 °C durante 10 segundos, a 55 °C durante 15 segundos y a 72 °C durante 20 segundos, concluyendo con un ciclo final a 72 °C durante 5 minutos [30].

Los productos del PCR fueron purificados mediante el kit QiaQuick para PCR (Qiagen, Hilden, Germany) y se cuantificaron usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, USA).

En una segunda etapa, se llevó a cabo otra PCR utilizando la misma mezcla de reacción que se empleó en la primera PCR [27]. No obstante, en esta ocasión se incorporaron secuencias índices cohesivas P5 y P7 que se hibridaron con los adaptadores de la célula de flujo del sistema de secuenciación MiSeq de Illumina [30]. Los primer utilizados para el PCR fueron:

P5: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3';

P7: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

El programa para esta PCR fue el mismo que para el primer PCR, con la excepción de que se llevaron a cabo solamente 8 ciclos de amplificación [30].

La finalidad de esta segunda PCR fue conseguir amplicones 16S que posean una combinación de índices única que la diferencia del resto.

A continuación, se preparó un tubo con el ADN genómico, el cual se mantuvo a -20 °C, y posteriormente se remitió a la empresa Biosinbiociencias (Quito, Ecuador) para la secuenciación con el sistema MiSeq de Illumina.

2.4. Análisis bioinformático

Para determinar la localización filogenética de los metagenomas, se compararon las secuencias obtenidas con secuencias de los genes 16S rRNA, disponibles tanto en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) como del EMBL-Bank (EMBL Nucleotide base de datos de secuencias). La asignación de los grupos putativos se realizó con el programa RDP (de Ribosomal Data Project) con un porcentaje de confiabilidad igual o superior al 90%. El análisis comparativo de las secuencias se realizó mediante BLAST (Basic Local Alignment Tool). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW y posteriormente se realizó la construcción de árboles filogenéticos, calculados mediante el algoritmo Neighbor Joining, NJ [31], utilizando el programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0. Se realizó un análisis de Bootstrap (1000 réplicas) para evaluar posibles topologías y generar árboles de consenso [32]. Las secuencias finales fueron identificadas por el sistema BLAST [26,

33] con una tasa de identidad del 99 % para bacterias (base de datos RefSeq 16S) y los resultados se visualizarán con gráficos Krona y tablas de clasificación taxonómica de unidades operativa.

2.5. Determinación de índices de biodiversidad

Para valorar la biodiversidad bacteriana presente en las muestras de leche se utilizaron los índices de biodiversidad riqueza específica de especies y el índice de Margalef. Para determinar la riqueza específica (S) se consideraron los datos del número total de especies bacterianas obtenidas en los estudios metagenómicos, tanto en la época de invierno, como en la época de verano [34, 35].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del estudio metagenómico

Los métodos basados en enfoques independientes del cultivo microbiano fundamentado en amplicones, pueden identificar con éxito los cambios en la microbiota asociados con el clima estacional, la gestión de granjas, la transferencia de leche del camión a las instalaciones de procesamiento de leche y la salud del animal. Estas técnicas permiten un análisis en profundidad de la microbiota de la leche y son capaces de detectar taxones que no se encuentran utilizando métodos de cultivo tradicionales [36, 37].

Para estudiar la diversidad bacteriana de la leche cruda bovina en el presente trabajo se utilizó la aproximación que dan las técnicas metagenómicas, comparando el microbioma bacteriano en época de invierno con el microbioma en la época de verano.

Los resultados generales obtenidos del estudio metagenómico para la muestra de leche cruda bovina procedentes del centro de acopio de Mocha en época de invierno y de verano se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del análisis metagenómico de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Época	Concentración libre-ría de ADN (ng/uL)	Amplicones	Número de lecturas	OTUs	Número de secuencias	Número de géneros	Número de especies	Número de bacterias
Invierno	31,33	609	254040	425	68539	48	99	68539
Verano	39.45	461	199110	427	72 470	46	95	72470

Nota: (OTUs): Unidad taxonómica operativa; (ng/uL): nanogramo/microlitro

Observando los resultados de la tabla 1 se puede indicar que fue posible analizar 68539 secuencias genómicas en las muestras de leche cruda bovina en la época de invierno, estas correspondieron a 425 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS), 48 géneros y 99 especies bacterianas, y para la época de verano, los resultados señalan 72470 secuencias correspondientes a 427 OTUS, con la presencia de 46 géneros y 95 especies bacterianas (Ver tabla 1).

Los resultados obtenidos en el estudio metagenómico, con relación al número de géneros y especies detectados, tanto en la época de invierno, como en la época de verano, indican que durante la época de verano el número de géneros y especies bacterianos se reducen ligeramente, al pasar de 50 géneros y 107 especies en la época de invierno, a 46 géneros y 95 especies

en la época de verano. Sin embargo, a pesar de que el número de especies disminuye ligeramente durante la época de verano, el número de individuos totales de la comunidad bacteriana aumenta significativamente al pasar de 62936 individuos en la época de invierno a 72470 individuos totales en la época de verano (Ver tabla 1).

En la época de invierno hay una disminución de la temperatura ambiental, lo cual repercute disminuyendo las tasas de crecimiento bacteriano de la mayoría de las bacterias mesófilas que forman parte de la microbiota de la leche, favoreciendo en este caso el crecimiento de especies de bacterias psicrófilas que son más variadas en su diversidad de especies, pero menos abundantes en número de individuos que las bacterias aerobias mesófilas, las cuales son generalmente parte de la microbiota de la leche, pero que pueden estar desfavorecidas en épocas cuando las temperaturas ambientales son más bajas [38].

Se ha señalado que las especies bacterianas que aumentan su diversidad en la época de invierno corresponden al grupo de las bacterias psicrófilas perteneciente al grupo de las gamma proteobacterias entre las cuales destacan la especies del género *Pseudomonas* [10, 39].

De igual manera, se debe considerar que, durante la época de verano, al aumentar la temperatura del ambiente, las bacterias heterótrofas presentes en el estiércol y en el ambiente se multiplican a una tasa más alta, este aumento del número de bacterias puede dar origen a una mayor transferencia de bacterias desde el medio ambiente hacia la leche, aumentando en este caso la población bacteriana de la leche [10, 40].

Resultados similares, en cuanto al número de especies e individuos en la comunidad bacteriana en diferentes épocas climáticas, han sido señalados por otros investigadores en diferentes partes del mundo, incluyendo países latinoamericanos [40-43].

En un estudio metagenómico realizado en Noruega por Skeie *et al.* en el año 2019 [44], donde se evaluó la composición bacteriana de la leche, los autores indican que la microbiota bacteriana se ve influenciada por el mes de muestreo, ello tomando en consideración si se trata de meses de lluvia con bastantes precipitaciones o no, así como la presencia de bajas o altas temperaturas en los meses de muestreo, ya que estos parámetros influyen en la tasa de reproducción bacteriana, y además, por la etapa de procesamiento en la que se obtienen las muestras, ya que existen fases del procesamiento de la leche donde pueden ocurrir contaminaciones cruzadas por parte del ambiente, uso de materiales y utensilios mal higienizados, o posibles contaminaciones por parte del personal que labora en los procesos, hecho que coincide con lo obtenido en la investigación realizada, donde se pudo observar cambios en la abundancia relativa del microbioma de la leche en invierno y verano, ello debido probablemente, al efecto del agua de las lluvias que puede actuar como un factor diluyente, así como las bajas y altas temperaturas de los meses de invierno y verano respectivamente, y por posibles contaminaciones de utensilios y operarios.

Los resultados del estudio metagenómico de la leche cruda bovina almacenada en el centro de acopio se encuentran detallados en la tabla 2 y en los gráficos Krona de las figuras 2, 3, 4 y 5, mismos que revelan la abundancia relativa de bacterias organizadas según la estructura filogenética de los grupos taxonómicos predominantes Terrabacterias y Proteobacterias.

En relación con el tipo de especies de bacterias que prevalecen en la leche cruda bovina que se recolectaron en el centro de acopio de Mocha, se puede indicar que existe un claro predominio de las bacterias Gram positivas (Terrabacterias), pertenecientes al grupo de las bacterias láctica (Firmicutes), sobre las bacterias Gram negativas (Proteobacterias), tanto en la época de invierno como la de verano (Ver tabla 2 y figuras 2 y 3).

Tabla 2. Distribución porcentual de biodiversidad bacteriana observada en los estudios metagenómicos de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Época estacional	Grupo filogenético (Clade)	Clase	Géneros (Número)	Especies (Número)	Cepas (Número)	Porcentaje del total (%)
Invierno						
	FCB	Bacteroidete	7	7	42	0,060
	Proteobacterias	α -proteobacterias	3	3	18	0,600
	Proteobacterias	β -proteobacterias	1	1	2	0,070
	Proteobacterias	γ -proteobacterias	21	59	2941	4,000
	Terrabacterias	Actinobacterias	7	7	187	0,300
	Terrabacterias	Firmicutes	9	22	65349	95,000
Verano						
	FCB	Bacteroidete	2	7	79	0,100
	Proteobacterias	α -proteobacterias	3	3	18	0,200
	Proteobacterias	β -proteobacterias	2	2	3	0,004
	Proteobacterias	γ -proteobacterias	20	43	8138	11,000
	Terrabacterias	Actinobacterias	4	10	220	0,300
	Terrabacterias	Firmicutes	12	27	64010	88,00

En la época de invierno (Ver tabla 2 y figura 2), con base en los datos de abundancia relativa, se observa que el género *Lactococcus* dominó la microbiota bacteriana con un 90,55% destacando entre ellas las especies *L. lactis* (53%), *L. raffinolactis* (23%), *L. piscium* (8%), *L. chungangensis* (6 %) y *L. garvieae* (1%).

Con respecto a los resultados en la época de verano (Ver tabla 2 y figura 3), se puede indicar, en base a los datos de abundancia relativa a nivel de género, que el 83,85 % de las bacterias presentes en la muestra de leche cruda bovina pertenecen al género *Lactococcus*, destacando entre ellas las especies *L. raffinolactis* (42%), *L. lactis* (38%), y *L. garvieae* (4%), muy similar a lo observado en la época de invierno.

Investigadores en diferentes partes del mundo han señalado que, en una leche de buena calidad sanitaria, existe el predominio de la población de bacterias láctica sobre los restantes grupos. Resultado que se evidencia en la presente investigación, donde los géneros predominantes fueron *Lactococcus* y *Leuconostoc* con porcentajes superiores al 70 % (Ver figuras 2 y 3) en las dos épocas climáticas evaluadas [11, 12, 15, 23, 36, 45-48].

Los resultados del presente trabajo difieren de los obtenidos por Skeie *et al.* en Noruega durante el año 2019 [44], quienes encuentran como los géneros bacterianos más abundantes *Pseudomonas* (26,6%), *Lactococcus* (12%), *Bacillus* (11 %) y *Streptococcus* (6,4%), mientras que en el presente estudio el género predominante en ambos muestreos fue *Lactococcus* representando el 84,04 y 92% en verano e invierno respectivamente (Ver figuras 2 y 3).

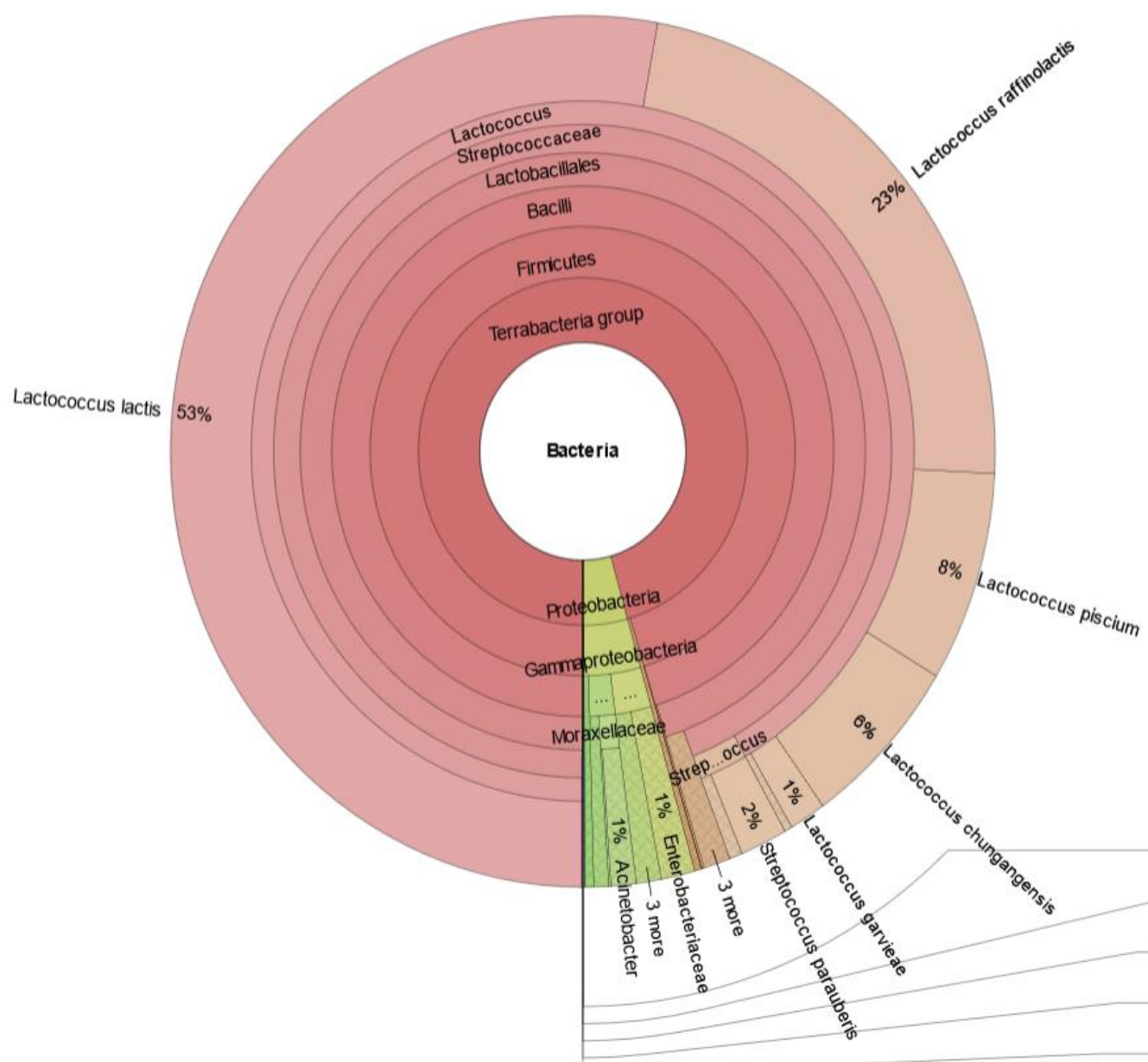


Figura 2. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos a nivel de género y especie, en muestras de leche cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de invierno.

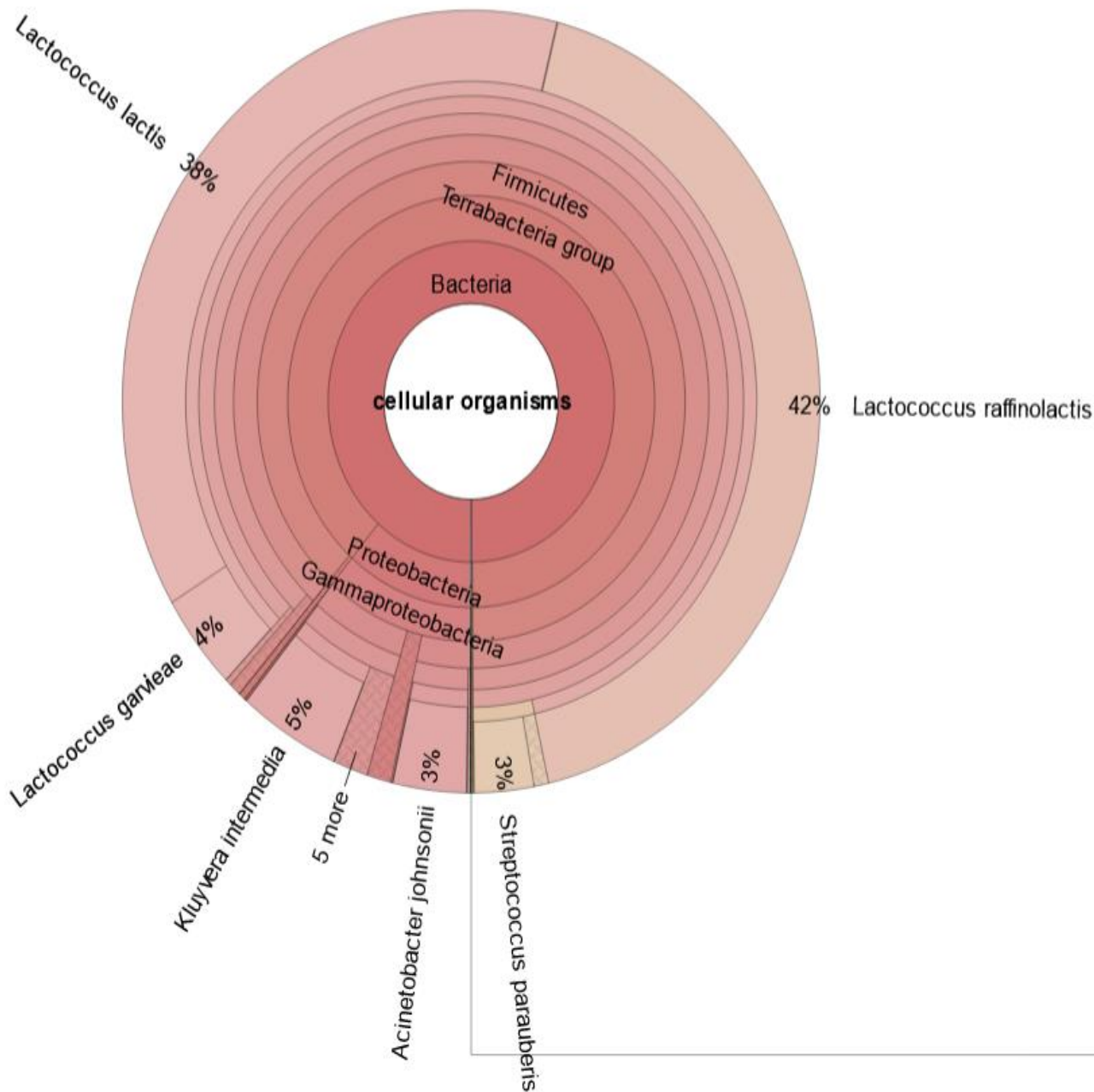


Figura 3. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos a nivel de género y especie, en muestras de leche cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de verano.



Figura 4. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos dentro de la clase γ Proteobacterias, en muestras de leche cruda bovina del centro de acopio Mocha, Tungurahua, Ecuador para la época de invierno.

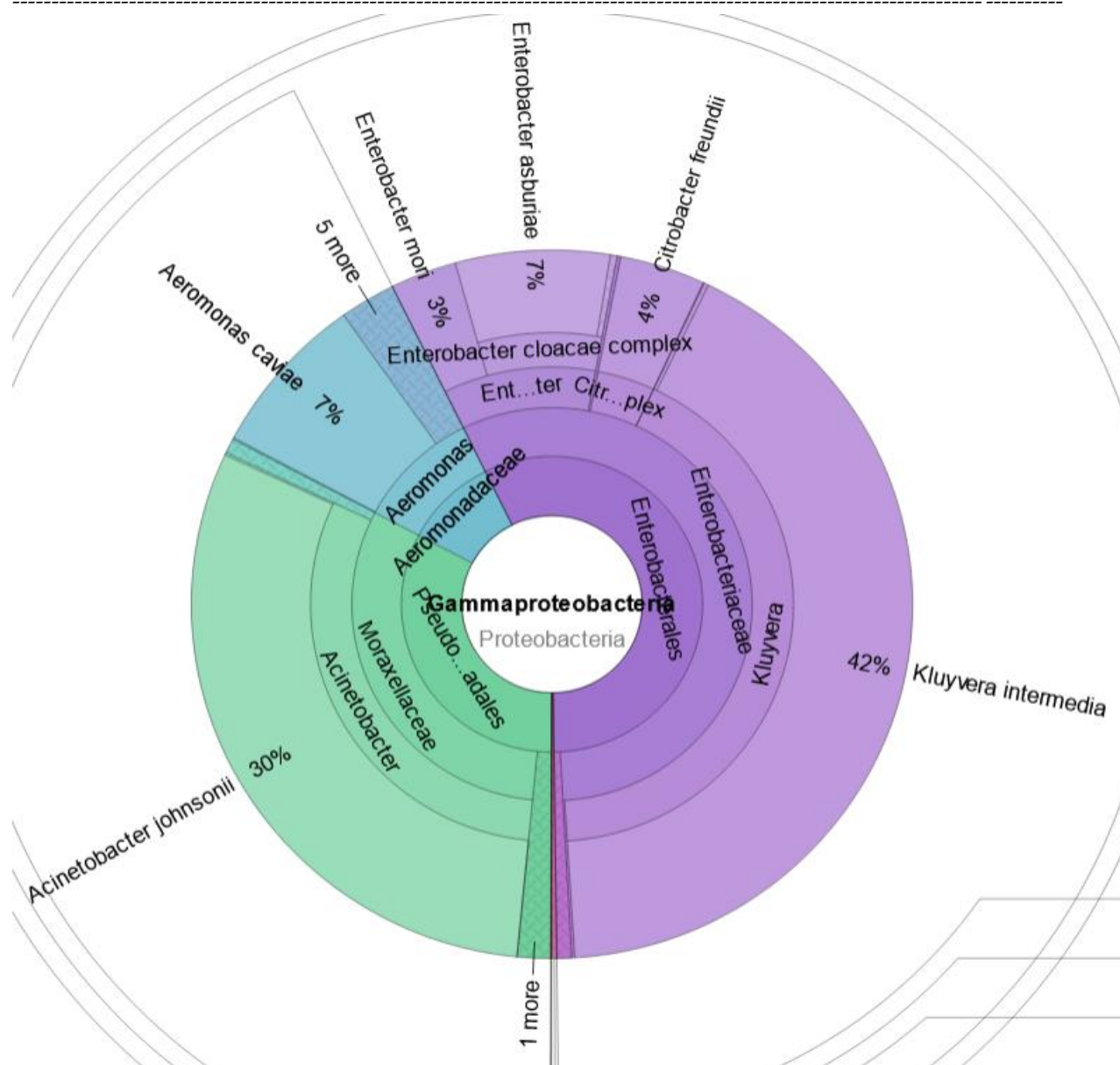


Figura 5. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos dentro de la clase γ Proteobacterias, en muestras de leche cruda bovina del centro de acopio Mocha, Tungurahua, Ecuador para la época de verano.

De igual forma, los datos obtenidos con los análisis metagenómico de la leche del centro de acopio de Mocha evidencian una composición de géneros y especies bacterianas muy diferentes a los encontrados por otros investigadores en diferentes partes del mundo, lo cual se puede deber a los múltiples factores que inciden en la composición microbiológica de la leche cruda bovina, siendo prácticamente imposible encontrar una leche con un microbiota de igual composición taxonómica de una región a otra [7, 39, 41, 42, 49].

Por otra parte, también se pudo observar en los resultados del análisis metagenómico la presencia de diversos géneros y especies del grupo de las Proteobacterias, prevaleciendo miembros de la clase γ proteobacterias en la época de verano respecto a la época de invierno (Ver tabla 2 y figuras 4 y 5).

Destaca dentro de la clase de las γ proteobacterias la presencia de miembros de la familia Enterobacteriácea y Pseudomonadales con una mayor diversidad en la época de invierno respecto

a la de verano (Ver figuras 4 y 5). A nivel de especies, en este grupo bacteriano en las épocas de invierno y verano prevalecieron las cepas de *Acinetobacter johnsonii* (18% vs 30%) y *Kluyvera intermedia* (14% vs 42%).

Dicha presencia puede estar indicando problemas de contaminación de la leche por factores ambientales o de higiene, así como la influencia de situaciones como la variación estacional (el aumento de temperatura incrementa la multiplicación de proteobacterias psicotrofas, entre ellas los miembros de la familia *Pseudomonadales*), las prácticas de higiene, la contaminación de los equipos de ordeño, entre otros factores [44, 50].

De igual forma, dentro de las γ proteobacterias se observó la presencia de bacterias potencialmente patógenas para los humanos, aunque en una baja proporción si se considera que se trata de una leche cruda que debe sufrir ulteriormente un proceso de pasteurización, por lo que no representaría un riesgo alto para la salud de los consumidores. Entre las especies detectadas resaltan miembros de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Klebsiella* (Ver figuras 4 y 5). La presencia de estas especies bacterianas, generalmente asociadas con la contaminación del agua y de la leche por contacto con la tierra, pueden incidir en la transmisión de infecciones alimentarias si la leche se consume cruda sin ningún tipo de procedimiento térmico de pasteurización, y además, pudieran ocasionar problemas de alteración de las propiedades organolépticas de la leche durante el almacenamiento de la leche, haciendo necesario que se advierta a los productores y responsables del centro de acopio, lo impórtate de implementar programas de limpieza y saneamiento, así como un control exhaustivo en la temperatura de refrigeración de la leche al momento de ser almacenada, además de realizar campañas para que este tipo de producto no sea dispensado a la población sin la debida pasteurización [1, 4, 5, 8].

Otra de las especies bacterianas detectadas en el análisis metagenómico de la leche cruda de Mocha, fue la especie del grupo de las terrabacterias *Streptococcus parauberis*, que se han relacionado con las infecciones como la mastitis en el ganado vacuno y que se observaron en mayor cantidad durante la época de invierno (Ver figuras 2 y 3).

Diverso autores han resaltado la utilidad de los análisis metagenómicos en la detección temprana de infecciones mastíticas en el ganado lechero, cuando hay una preponderancia en la microbiota bacteriana de la leche de bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y de las especies de la familia de las *Enterobacteriaceae*, se deben tomar medidas sanitarias, ya que además de poner en riesgo la calidad de la leche, se afecta la salud del rebaño [3, 9, 51-54].

Hoque y colaboradores en un estudio realizado Bangladesh durante el año 2019 [55], analizaron la asociación entre la diversidad del microbioma y la mastitis bovina, comparando el microbioma de la mastitis clínica y las muestras de leche sana a través de la secuenciación del metagenoma completo. Se identificó 363 y 146 cepas bacterianas en muestras de leche mastítica y sana respectivamente y se detectó 356 y 251 géneros bacterianos respectivamente con prevalencia de las especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, indicando que podría ser una característica de las leches mastíticas la pérdida de biodiversidad.

Así mismo, en otro estudio realizado en Colombia en el año 2019, se analizó la leche mastítica por metagenómica, los perfiles filogenéticos revelaron cuatro filos dominantes: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes, detectándose alrededor de 394 géneros con abundancia variable donde *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fueron los géneros predominantes, resultados totalmente diferentes a lo observado en la presente investigación [56].

Si bien no se han encontrado estudios metagenómicos de la leche cruda bovina de Ecuador, con los cuales se pueda hacer una comparación de las abundancias bacterianas y de la composición taxonómica de la misma, las diferencias con respecto a las condiciones climáticas y la altitud, la diferencia en las prácticas agrícolas, la alimentación del ganado y las prácticas

de higiene, así como las diversas fuentes de contaminación que pueden estar presentes, podrían explicar las diferencias en la estructura de la microbiota de la leche cruda recolectada en el centro de acopio de Mocha, con respecto a las indicadas por autores de otras partes del mundo [39, 40, 42, 44, 47, 49, 51, 57, 58].

3.2. Análisis de los índices de biodiversidad bacteriana presente en la leche cruda

A fin de cuantificar la biodiversidad bacteriana, se determinaron los índices de riqueza específica y el índice de diversidad de Margalef. Los resultados de estas determinaciones se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Índices de biodiversidad de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Índice de biodiversidad	Muestra en verano	Muestra en invierno
Riqueza específica	92	116
Índice de diversidad de Margalef	8,22	10,41
N° total de bacterias encontradas	72470	68539

Los índices de biodiversidad, evidencian que la época de invierno fue donde se encontró la mayor riqueza y biodiversidad de especies bacterianas en comparación con la época de verano, aunque el número de bacterias es mayor en época verano respecto a la de invierno, lo que se pueden explicar por el efecto de la temperatura en la velocidad del crecimiento de las bacterias, así como en el tipo de manejo que se le da al ganado en las épocas de lluvia y en las épocas de verano.

Los índices de biodiversidad se han utilizado muy pocos en la cuantificación de la biodiversidad bacteriana presente en muestras de leche cruda bovina en las diferentes estaciones del año. Se ha aplicado generalmente en estudios que comparan la biodiversidad de la leche producidas en diferentes zonas de un país [10].

Los valores en los índices de biodiversidad ratifican los resultados que se han obtenido en el análisis metagenómico desde el punto de vista estadístico y señalan diferencias en cuanto a la diversidad bacteriana en las épocas de invierno y verano evaluadas.

4. CONCLUSIONES

El estudio metagenómico reveló una microbiota bacteriana característica de la leche de la zona de estudio con predominio del grupo de las Terrabacterias, seguida de las Proteobacterias. Además de una gran abundancia de células bacterianas diferentes en ambas épocas, destacando la presencia del género *Lactococcus* en el verano como en el invierno.

Los índices de biodiversidad señalan diferencias entre la riqueza de especies en la época de invierno y verano, siendo mayor la diversidad bacteriana en la época de invierno, aunque el número de individuos de la población sea menor.

La presencia mayoritaria de especies del grupo de las bacterias lácticas en la leche cruda bovina de la zona estudiada es un indicativo de la buena calidad de la leche, y, además, abre las posibilidades de hacer estudios para conocer las bondades biotecnológicas y tecnológicas de estas cepas bacterianas en la producción de derivados lácteos con denominaciones de origen.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores dejan constancia que no existen ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada y los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

1. A.M. Aguilera-Becerra, E. X. Urbano-Cáceres & C.P. Jaimes-Bernal. Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, **11**(2), 83–93 (2014). Doi: <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
2. M.J. Santolaya-Hernández. *Análisis microbiológico y físico-químico de la leche*. Tesis de Maestría. Centro de estudios de postgrados, Universidad de Jaén, Jaén, España, 2018; 81 p. URL: <https://crea.ujaen.es/items/f5a63706-00d6-45d4-a86b-c60acb6a5bb5>
3. R.I.Z.A. Durmaz. Comparison of milk microbiota between healthy and mastitic cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **48**(1), 17–32 (2024). Doi: <https://doi.org/10.55730/1300-0128.4333>
4. D.A. Agurto-Granda. *Análisis de la microbiota asociada a la leche cruda para la toma de decisiones sobre buenas prácticas de manejo en actividades de acopio a gran escala*. Tesis de Maestría. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador, 2020; 45 p. URL: <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/27072>
5. N.H. Martin, R.L. Evanowski & M. Wiedmann. *Invited review: Redefining raw milk quality—Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products*. *Journal of Dairy Science*, **106**(3), 1502–1517 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22416>
6. E. Parente, A. Ricciardi & T. Zotta. The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, **107**, 104714 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>
7. S. Ryu, W.S. Park, B. Yun, M. Shin, G.W. Go, J.N. Kim & Y. Kim. Diversity and characteristics of raw milk microbiota from Korean dairy farms using metagenomic and culturomic analysis. *Food Control*, **127**, 108160 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108160>
8. A. J. Ouamba, M. Gagnon, G. LaPointe, P.Y. Chouinard & D. Roy. *Graduate Student Literature Review: Farm management practices: Potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk*. *Journal of Dairy Science*, **105**(9), 7276–7287 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21758>
9. A.P. Paliy, Y.S. Ulko, O.O. Bogomolov, L.V. Kis-Korkishchenko, M.D. Kambur, A.A. Zamazyi & A.P. Paliy. Species composition of microbiota of cow's udder and raw milk quality at mastitis. *Ukrainian Journal of Ecology*, **10**(4), 78–85 (2020). URL: <https://www.ujecology.com/articles/species-composition-of-microbiota-of-cows-udder-and-raw-milk-quality-at-mastitis.pdf>
10. X. Guo, Z. Yu, F. Zhao, Z. Sun, L.Y. Kwok & S. Li. Both sampling seasonality and geographic origin contribute significantly to variations in raw milk microbiota, but sampling seasonality is the more determining factor. *Journal of Dairy Science*, **104**(10), 10609–10627 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20480>
11. R.C. Reuben, P.C. Roy, S.L. Sarkar, A.R.U. Alam & I.K. Jahid. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, **103**(2), 1223–1237 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
12. W. Zhang, S. Lai, Z. Zhou, J. Yang, H. Liu, Z. Zhong & G. Peng. Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk. *Frontiers in Microbiology*, **13**, 918774 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918774>
13. D. Zhang, J. Palmer, K.H. Teh & S. Flint. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage. *LWT*, **134**, 110165 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110165>

14. D.S. Kocabaş, J. Lyne & Z. Ustunol. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market, and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, **119**, 467–475 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>
15. L. Bettera, A. Levante, E. Bancalari, B. Bottari & M. Gatti. Lactic acid bacteria in cow raw milk for cheese production: Which and how many? *Frontiers in Microbiology*, **13**, 1092224 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092224>
16. D. Guevara-Freire, M. Montero-Recalde, A. Rodríguez, L. Valle, D. Avilés-Esquivel. Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **30**(1), 247–255 (2019). URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n1/a25v30n1.pdf>
17. M.G. Buste-Sabando & G.M. López-Vera. *Mejoramiento de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de los sistemas bovinos del cantón el Carmen*. Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica de Manabí, Manabí, Ecuador, 2019. URL: <https://repositorio.esпам.edu.ec/handle/42000/1130>
18. R. Contero, N. Requelme, C. Cachipiendo & D. Acurio. Calidad de la leche cruda y sistema de pago por calidad en el Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, **33**(1), 31–43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.03>
19. A. Salguero, D. De la Torre, B. Puga-Torres. Calidad de leche cruda de pequeños productores de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, Ecuador, mediante análisis fisicoquímicos y ensayos cualitativos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **34**(1), e24611 (2023). Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v34i1.24611>
20. E.M.T. Valencia & J.G.O. Tejedor. Análisis bacteriológico de leche cruda expendida en Tarqui-Ecuador. *Anatomía Digital*, **6**(3), 116–1431 (2023). Doi: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.2619>
21. S.M.Y. Asanza, J.D.M. Castillo, C.E.S. Calderón, S.G.M. Loaiza, A.R.F. Acosta & L.E. Zuñiga-Moreno. Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenida por ordeño manual. *Revista Alfa*, **8**(22), 69–83 (2024). URL: <https://www.revistaalfa.org/index.php/revistaalfa/article/view/332/813>
22. E.V. Doll, L. Staib, C. Huptas, S. Scherer & M. Wenning. *Facklamia lactis* sp. nov., isolated from raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **71**(7), 004869 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004869>
23. T. Zotta, A. Ricciardi, N. Condelli & E. Parente. Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**(14), 3898–3912 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870927>
24. Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). *Norma Técnica Ecuatoriana. Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico*. NTE INEN 1529-2, 2013. Quito, Ecuador.
25. M.J. Cox, W.O. Cookson & M.F. Moffatt. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, **22**, R88–R94 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398>
26. F. Valenzuela-González, R. Casillas-Hernández, E. Villalpando & F. Vargas-Albores. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, **41**(4), 297–313 (2015). Doi: <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
27. A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn & F. Olive. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, **41**(1), e1 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
28. D.P.R. Herlemann, M. Labrenz, K. Juergens, S. Bertilsson, J.J. Waniek & A.F. Andersson. Transition in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, **5**(10), 1571–1579 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
29. N. Corcoll, T. Osterlund, L. Sinclair, A. Eiler, E. Kristiansson, T. Backhaus & K. Eriksson. Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(14), fnx139 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>
30. M. Laserna & M. Claesson. *Library generation through ribosomal RNA 16S genes amplification for determining microbiota composition*. Laboratory Medicine at a glance. School of Microbiology and APC

- Microbiome Institute, University College Cork, Cork, Ireland. 2016; pp. 9–13. URL: https://www.researchgate.net/publication/311982398_Creacion_de_librerias_mediante_amplificacion_del_ARN_ribosomal_16S_para_la_caracterizacion_de_la_microbiota_Library_generation_through_16S_ribosomal_RNA_gene_amplification_for_determining_microbiota_c
31. N. Saitou & M. Nei. The Neighbor-Joining method: a new method of reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), 406–425 (1987). Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
32. J. Felsenstein. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**(4), 783–791 (1985). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
33. National Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado en febrero de 2023.
34. G. Halffter (Compilador). *La biodiversidad biológica de Iberoamérica I*. CYTED-B: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Instituto de Ecología, A.C. Secretaria de Desarrollo Social, Xalapa, México, 1992; 204 p. URL: https://rds.org.co/apc-aa-files/ba03645a7c069b5ed406f13122a61c07/diversidad_biologica_iberoamerica.pdf
35. A. Magurran. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, USA, 1988.
36. P. Cremonesi, C. Ceccarani, G. Curone, M. Severgnini, C. Pollera, V. Bronzo, F. Riva, M.F. Addis, J. Filipe & M. Amadori. Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PloS One*, **13**(10), e0205054 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>
37. B. Hornik, J. Czarny, J. Staninska-Pięta, L. Wolko, P. Cyplik & A. Piotrowska-Cyplik. The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characteristics by NGS analysis method. *Molecules*, **26**(16), 5029 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26165029>
38. M.P. Doyle, F. Diez-González & C. Hill. *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 5th ed. ASM Books, Washington, USA, 2019.
39. M.E. Kable, Y. Srisengfa, M. Laird, J. Zaragoza, J. McLeod, J. Heidenreich & M.L. Marco. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *mBio*, **7**(4), e00836-16 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.00836-16>
40. A. Morillo. *Microbiota de la leche cruda en el Estado Mérida*. Tesis de Maestría. Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 2014.
41. I.S. Kim, Y.K. Hur, E.J. Kim, Y.T. Ahn, J.G. Kim, Y.J. Choi & C.S. Huh. Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **30**(11), 1643–1650 (2017). URL: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0689>
42. N. Li, Y. Wang, C. You, J. Ren, W. Chen, H. Zheng & Z. Liu. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific Reports*, **8**(1), 2371 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20862-8>
43. M. Yap, O. O'Sullivan, P.W. O'Toole, J.J. Sheehan, M.A. Fenelon & P.D. Cotter. Seasonal and geographical impact on the Irish raw milk microbiota correlates with chemical composition and climatic variables. *mSystems*, **9**, e01290-23 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1128/msystems.01290-23>
44. S.B. Skeie, M. Håland, I.M. Thorsen, J. Narvhus & D. Porcellato. Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *Journal of Dairy Science*, **102**(3), 1959–1971 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14083>
45. L. Quigley, O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald & P.D. Cotter. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **150**(2-3), 81–94 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
46. M. Addis, A. Tanca, S. Uzzau, G. Oikonomou, R. Bicalho & P. Moroni. The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from-omics studies. *Molecular BioSystems*, **12**(8), 2359 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>
47. W. Chen, J. Mi, N. Lv, J. Gao, J. Cheng, R. Wu, J. Ma, T. Lan & X. Liao. Lactation stage-dependency of the sow milk microbiota. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 945 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00945>

48. D. Porcellato, M. Aspholm, S.B. Skeie, M. Monshaugen, J. Brendehaug & H. Mellegård. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, **266**, 21–30 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.004>
49. G. Oikonomou, M.F. Addis, C. Chassard, M.E.F. Nader-Macias, I. Grant, C. Delbès & S. Even. Milk microbiota: What are we exactly talking about? *Frontiers in Microbiology*, **11**, 60 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00060>
50. V. Ntuli, P.M.K. Njage & E.M. Buys. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. *Journal of Dairy Science*, **99**(12), 9534–9549 (2016). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11403>
51. G. Oikonomou, V.S. Machado, C. Santisteban, Y.H. Schukken & R.C. Bicalho. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLoS One*, **7**(10), e47671 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>
52. G. Oikonomou, M.L. Bicalho, E. Meira, R.E. Rossi, C. Foditsch, V.S. Machado, A.G.V. Teixeira, C. Santisteban, Y.H. Schukken & R.C. Bicalho. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One*, **9**(1), e85904 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085904>
53. H. Derakhshani, K.B. Fehr, S. Sepehri, D. Francoz, J. De Buck, H.W. Barkema, J.C. Plaizier & E. Khafipour. *Invited review*: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, **101**(12), 10605–10625 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>
54. S.A. Metzger, L.L. Hernández, S.G. Garret, L. Pamela & P.L. Ruegg. Understanding the milk microbiota. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **34**(3), 427–438 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.003>
55. M.N. Hoque, A. Istiaq, R.A. Clement, M. Sultana, K.A. Crandall, A.Z. Siddiki & M.A. Hossain. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Scientific Reports*, **9**(1), 13536 (2019). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49468-4>
56. M.Y. Coronado-Vélez. *Microbiota de la leche cruda de bovinos infectados con mastitis subclínica analizados mediante secuenciación del gen 16S rRNA*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia, 2019; 35 p. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76685>
57. F. Breitenwieser, E.V. Doll, T. Clavel, S. Scherer & M. Wenning. Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 549577 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01557>
58. O. Nikoloudaki, W.J. Lemos Junior, L. Borruso, S. Campanaro, M. De Angelis, R.F. Vogel & M. Gobetti. How multiple farming conditions correlate with the composition of the raw cow's milk lactic microbiome. *Environmental Microbiology*, **23**(3), 1702–1716 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15407>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.K. Albuja-Landi, P. Arguello-Hernández, S. Escobar-Arrieta, V. Cando-Brito, J. Araque & F. Andueza. Microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 113–130 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciq-uifa.v54n1.114032>

Scientific research article

Predicting drug solubility in cosolvent systems using artificial intelligence algorithms

Neiba Yadira Echeagaray-Solorza¹, Yennifer Díaz-Romero², Lucila Guadalupe Tobón Galicia³ & Sebastián Tejada Paniagua^{4*}

¹ Universidad Autónoma de Sinaloa, El Rosario, Sinaloa, México, E-mail: neibaecheagaray@uas.edu.mx

² Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México, E-mail: yenniferdr07@ms.uas.edu.mx

³ Tecnológico Nacional de México, Campus Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, E-mail: lucila.tobon@itstb.edu.mx

⁴ Grupo de Investigación de Ingenierías UCC-Neiva, Facultad de Ingeniería, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Neiva, Calle 11 No. 1-51, Neiva 410001, Huila, Colombia

*E-mail: inv.des.ingenierias@gmail.com

Received: December 12, 2024

Corrected: January 20, 2025

Accepted: January 27, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119553>

SUMMARY

Introduction: Solubility is one of the most important physicochemical properties in the pharmaceutical sciences and is involved in processes ranging from drug development to environmental biotoxicity assessment. Accurate prediction of solubility, especially aqueous solubility, has been a scientific challenge due to the complexity of the dissolution process, which involves lattice energies, solvation, solute ionization, and solute-solvent interactions. While various approaches have been used to predict solubility, such as semi-empirical models and group contribution methods, accurate prediction remains difficult. Statistical and machine learning approaches often use numerous descriptors, making rational interpretation and refinement of prediction models difficult. **Purpose:** This study proposes an approach based on autonomous learning, specifically using a neural network model. Experimental and theoretical descriptors are carefully selected according to their relevance to physicochemical aspects of the dissolution process. **Methodology:** A solubility data set of four structurally related sulfonamides (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, and sulfacetamide) in different solvents under different temperature conditions and cosolvent composition is used to develop an artificial neural network model using less than 37 descriptors. **Results:** The developed AI algorithm shows acceptable correlation with experimental data, suggesting its potential as an approximation tool for optimizing solubility-related processes in the pharmaceutical industry.

Key words: solubility; drugs; pharmacy; artificial intelligence; neural network.

RESUMEN

Predicción de la solubilidad de fármacos en sistemas cosolventes mediante algoritmos de inteligencia artificial

Introducción: La solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes en las ciencias farmacéuticas, esta propiedad está involucrada en diversos procesos, desde el desarrollo de fármacos hasta la evaluación de la biotoxicidad en el campo ambiental. La predicción precisa de la solubilidad, particularmente la solubilidad acuosa, ha sido un desafío científico debido a la complejidad del proceso de disolución, que involucra energías de red, solvatación, ionización del soluto e interacciones soluto-solvente. Si bien se han utilizado diversos enfoques para predecir la solubilidad, como modelos semi-empíricos y métodos de contribución de grupos, la predicción precisa sigue siendo difícil. Los enfoques estadísticos y de aprendizaje automático a menudo emplean numerosos descriptores, lo que dificulta la interpretación racional y el perfeccionamiento de los modelos de predicción. **Objetivo:** Este estudio se propone un enfoque basado en el aprendizaje autónomo, específicamente mediante un modelo de red neuronal. Se seleccionan cuidadosamente descriptores experimentales y teóricos de acuerdo con su relevancia para los aspectos fisicoquímicos del proceso de disolución. **Metodología:** Se utiliza un conjunto de datos de solubilidad de cuatro sulfonamidas estructuralmente relacionadas (sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina y sulfacetamida) en varios solventes bajo diferentes condiciones de temperatura y composición de cosolvente, desarrollando un modelo de redes neuronales artificiales utilizando bajo 37 descriptores. **Resultados:** El algoritmo de IA desarrollado muestra una correlación aceptable con los datos experimentales, lo que sugiere su potencial como herramienta de aproximación para optimizar los procesos relacionados con la solubilidad en la industria farmacéutica.

Palabras clave: Solubilidad; fármacos; farmacia; inteligencia artificial; red neuronal.

RESUMO

Predição da solubilidade de fármacos em sistemas cosolventes usando algoritmos de inteligência artificial

Introdução: Solubilidade é uma das propriedades físico-químicas mais importantes nas ciências farmacêuticas. Esta propriedade está envolvida em vários processos, desde o desenvolvimento de fármacos até a avaliação da biotoxicidade no campo ambiental. A previsão precisa da solubilidade, particularmente da solubilidade aquosa, tem sido um desafio científico devido à complexidade do processo de dissolução, que envolve energias de rede, solvatação, ionização do soluto e interações soluto-solvente. Embora várias abordagens tenham sido usadas para prever a solubilidade, como modelos semi-empíricos e métodos de contribuição de grupo, a previsão precisa continua difícil. Abordagens estatísticas e de aprendizado de máquina geralmente empregam vários descritores, dificultando a interpretação racional e o refinamento dos modelos de previsão. **Objetivo:** Este estudo propõe uma abordagem baseada na aprendizagem autônoma, especificamente utilizando um modelo de rede neural. Descritores experimentais e teóricos são cuidadosamente selecionados de acordo com sua relevância para os aspectos físico-químicos do processo de dissolução. **Metodologia:** Um conjunto de dados de solubilidade de quatro sulfonamidas estruturalmente relacionadas (sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina e sulfacetamida) em vários solventes sob diferentes condições de temperatura e composição de cosolvente é usado, desenvolvendo um modelo de rede neural artificial usando menos de 37 descritores. **Conclusão:** O algoritmo de IA desenvolvido mostra correlação aceitável com dados experimentais, sugerindo seu potencial como uma ferramenta de aproximação para otimizar processos relacionados à solubilidade na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Solubilidade; drogas; farmácia; inteligência artificial; rede neural.

1. INTRODUCTION

Drug solubility is a critical property in many processes ranging from drug development (prediction of synthetic routes, extraction and crystallization [1], purification, recrystallization, quantification, preformulation, formulation, quality analysis among others (design of chemical processes), it is also a determining factor in the therapeutic performance of the drug (availability, distribution, metabolism, excretion and toxicity). In the environmental field, solubility also plays an important role in bioremediation processes and biotoxicity [2] assessment [3, 4].

In this context, the prediction of aqueous solubility has been the subject of intensive research [5], using various approaches such as semi-empirical models, such as the general solubility equation [6, 7], group contribution methods (UNIFAC, UNIQUAC.) [8, 9], van't Hoff [10], extended Hildebrand solubility approach [11-13], two-parameter Weibull function model [14, 15], Buchowski-Ksiazczak [16], van't Hoff-Yaws [17], Apelblat [18, 19], Wilson [20], NRTL [20], modified Wilson [21, 22]. More recent developments have focused on quantitative structure-activity relationship (QSAR/QSPR) [23, 24], through statistical analysis and autonomous learning techniques [25]. Despite these advances, accurate solubility prediction remains a major scientific challenge, as exemplified by the two solubility challenges presented to the research community in 2008 and 2019 [26, 27]. This is due to the complex nature of the dissolution process, which involves lattice/sublimation energy, solvation energy, solute ionization and phase interactions [28-30]. Each of these properties is difficult to predict and can be computationally expensive [31]. Statistical and automatic learning approaches often use many descriptors (>100) [32], which has led to difficulties in rational interpretation and improvement of prediction models [33]. Finally, prediction is hampered by the poor quality of experimental solubility data, which is affected by measurement techniques and the purity of the solute and solvents [34-36].

In this paper we report on an approach to predict drug solubility in cosolvent mixtures at different temperatures by means of autonomous learning, specifically by means of a neural network model, where experimental and theoretical descriptors have been selected according to their relevance to the physicochemical aspects of the dissolution process (Figure. 1).

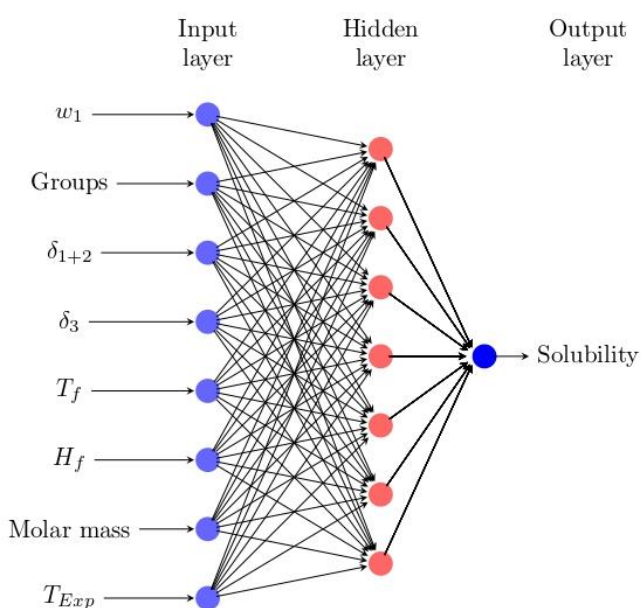


Figure 1. Artificial neural network schematic of the AI-Solubility algorithm.

2. METHODOLOGY

This work presents the development of an artificial neural network to predict drug solubility using 38 descriptors (Table 1).

The model development was carried out in the Google Colaboratory environment, using the NumPy (version 1.25.2), Pandas (version 2.0.3) and Matplotlib (version 3.7.1) libraries for data processing and plotting. The 4615 available data were split into 80% training data and 20% test data using the `train_test_split` function of the scikit-learn library with a random seed of `random_state=0`. The data were then normalized.

The data was then normalised using the StandardScaler method. A neural network was implemented with an input layer of 38 neurons, a hidden layer of 128 neurons and a ReLu activation function, and an output layer of one neuron and a ReLu activation function to predict solubility.

The neural network was trained using the Adam optimizer with a learning rate (`learning_rate=0.001`) of 35 epochs using the Keras library of TensorFlow. To avoid overfitting, Dropout, with a dropout rate of 20%, was used as a regularization technique by deactivating neurons during training to avoid overfitting. The different accuracy metrics were evaluated to analyze the model performance.

Table 1. Descriptors used in AI algorithm development.

N	Descriptors	Unit/symbol/name	N	Descriptors	Unit/symbol/name
1	Study temperature	K	20	Group 14	Phenyl (trisubstituted)
2	Molar mass	g/mol	21	Group 15	Phenyl (tetrasubstituted)
3	Melting temperature	K	22	Group 16	Ring closure, 5 or more atoms
4	Melting enthalpy	kJ/mol	23	Group 17	Ring closure, 3 or 4 atoms
5	Hildebrand solubility parameter of the drug (δ_3)	MPa ^{1/2}	24	Group 18	Conjugation in ring, for each double bond
6	Group 1	-CH ₃	25	Solvent 1	Water
7	Group 2	-CH ₂ -	26	Solvent 3	N-Methyl-2-pyrrolidone
8	Group 3	>CH-	27	Solvent 4	Carbitol
9	Group 4	>C<	28	Solvent 5	<i>tert</i> -butyl
10	Group 5	-NH ₂	29	Solvent 5	<i>N,N</i> -dimetilformamida
11	Group 6	-NH-	30	Solvent 7	Dimethyl sulfoxide
12	Group 7	>N-	31	Solvent 8	Methanol
13	Group 7	-CO-	32	Solvent 9	Ethanol
14	Group 8	-COOH	33	Solvent 10	1-Propanol
15	Group 9	-SO ₂	34	Solvent 11	Acetonitrile
16	Group 10	-O-	35	Solvent 12	Ethylene glycol
17	Group 11	-F	36	Solvent 13	Propylene glycol
18	Group 12	Phenyl	37	Solvent 13	1,4-dioxane
19	Group 13	Phenyl (<i>o</i> , <i>m</i> <i>p</i>)	38	Hildebrand solubility parameter of solvents and cosolvent mixtures (δ_{1+2})	MPa ^{1/2}

3. RESULTS AND DISCUSSION

For the development of the AI algorithm, solubility data reported in the literature were used for 4 structurally related drugs (sulfonamides), sulfadiazine (SD) [37-47], sulfamerazine (SMR) [3, 37, 42, 47-53], sulfamethazine (SMT) [37, 42, 46, 49, 54-59], sulfacetamide (SCT) [60] in the solvents listed in Table 1. Thus, 4615 solubility data were obtained under different temperature and cosolvent composition conditions.

The first one is the study temperature, the influence of this descriptor is described in most of the solubility studies, presenting a positive effect, since as the temperature increases the studies show that the solubility also increases, this is because higher temperatures provide more kinetic energy to the molecules helping them to break free from the crystal lattice and dissolve in solvent; in general, energy is required to break the bonds holding the molecules in the solid together; the second descriptor is the molar mass of the drug, Sverre describes how in most of the cases the solubility shows a relationship with the molar mass of the drug [61]. Theoretically, as the molar mass of the drug increases, so does its molar volume, so theoretically, as the molar mass of the drug increases, its solubility would decrease because it becomes more difficult for the solvent molecules to retain the solute particles [62]. However, the studies reported by Delgado *et al.* show an inverse relationship to those reported by Toll *et al.* and Johnsen *et al.* [38, 49, 63], showing that as the molar volume decreases, the solubility decreases; a clear example is the solubility of SD, SMR and SMT, as the molar volume decreases (SD (150.0 cm³/mol)<SMR (164.5 cm³/mol)<SMT (179.0 cm³/mol)), so does the solubility (solubility in water at 298. 15 K SD ($x_3=0.4809\pm0.0023\cdot10^5$) < SMR ($0.1712\pm0.0027\cdot10^4$) < ($0.2814\pm0.014\cdot10^4$)). In addition to demonstrating the direct relationship between solubility and molar volume, the results of the work of Delgado *et al.* showed a clear relationship between solubility and the temperature and enthalpy of fusion of the drug, being more soluble the drugs with lower temperatures and enthalpies of fusion (SD ($T_f=532.65$ K; $\Delta_f H=44.3\pm0.4$ kJ·mol⁻¹); SMR ($T_f=508.15$ K; $\Delta_f H=41.3\pm1.0$ kJ·mol⁻¹); SMT ($T_f=468.15$ K; $\Delta_f H=39.2\pm0.7$ kJ·mol⁻¹)) (descriptors 3 and 4). In general, the relationship between descriptors 1, 3 and 4 is well described in the theory of regular solutions and ideal solubility [64-68]. The fifth descriptor is the solubility parameter of the drug, several studies have shown a relationship between the solubility and the solubility parameter of the drug, showing that the maximum solubility is obtained in solvents or cosolvent mixtures with solubility parameters similar to those of the drug [4, 69-72], however, other studies by Cardenas *et al.*, Delgado *et al.* and Ortiz *et al.* show an opposite behavior [3, 51, 59, 73].

Descriptors 6-24 focus on the Group Contribution Method, which decomposes each chemical compound into first-, second-, and third-order functional groups based on its molecular structure. The number of each different functional group present in a compound is used as a predictor in a multiple linear regression model without attempting to reduce the number of parameters in the model, as the method attempts to characterize the contributions of each different group. Thus, molecular properties are the result of aggregate contributions from individual atoms or groups [74-82]. The equilibrium solubility of a solute depends on the relative affinity between the solvent molecules and the solute molecules. Therefore, the forces of molecular interactions such as ionic, van der Waals, dispersion and hydrogen bonding interactions affect solubility. In this context, descriptors 25-37 correspond to the cosolvent composition expressed as the mass fraction (w_1) of each of the solvents [83-88]. Finally, parameter 38 is the solubility parameter of the solvent or cosolvent mixture; a large number of works have demonstrated the relationship between this descriptor and solubility [85, 89-92].

When evaluating the individual relationship of each of the descriptors with the solubility data, the coefficients of determination (r^2) do not exceed 0.2, showing F between 5- 424.6, which is extremely small for an N of 3615 data, demonstrating the low correlation between each of the descriptors and solubility.

The database can be queried or downloaded from the Mendeley repository [93], and all development code can also be downloaded from the Mendeley repository [94].

The function `train_test_split(X, y, ...)` first splits the data into a training set and a test set, then the parameter `test_size` specifies the percentage of the data to be used for the test set. In this case, the value is 0.2, which means that 20% of the data is used to test the model, and the remaining 80% is used to train the model. That is, 80% of the total data set was used to train the model, and the remaining 20% was used to evaluate the model's performance. To ensure that we were working with the same split each time we ran the code, we set the parameter and set a seed for randomization with `random_state=0`.

For the model to be meaningful, it is important that the data be scaled uniformly. Otherwise, some features with large values may dominate the model, while others with small values may be ignored. Therefore, an object of the `StandardScaler` class of the `sklearn.preprocessing` library is created to standardize or scale the data features.

Once the data partitioning and scaling parameters are set, the neural network model is defined and compiled in Keras for training, using `keras.Sequential()` to create a sequential model. In this type of model, the layers are stacked in a linear fashion, i.e. the output of one layer is the input of the next; then a dense layer is added with `layers.Dense(128, ...)`, which is a fully connected layer. This layer will have 128 neurons. The size of the network input is specified, in this case the inputs have 66 features (which could refer to a dataset with 37 columns, for example).

A Dropout layer (regularization) is set using `Layers.Dropout(0.2)`, so that at each training step, this layer randomly deactivates a percentage of the neurons in the previous layer, in this case 20% (0.2). Dropout is a technique to prevent overfitting, helping the model not to become too dependent on certain neurons, and therefore to generalize better to unseen data. Add another dense layer with 64 neurons (`model.add(layers.Dense(64, activation='relu'))`), using ReLU as the activation function. This layer also follows the same structure as the previous ones, and its size and activation are chosen to learn more complex features, finally an output layer (`model.add(layers.Dense(1))`) of 1 neuron is generated.

The Keras model is set up for training with the Adam optimizer, using a learning rate of 0.001. In addition, the loss function is specified, which was the mean square error, and the predictions were evaluated using the mean absolute error, which is commonly used for regression problems. It measures the difference between the values predicted by the model and the actual values, penalizing larger errors due to squaring.

The code trains the model for 35 epochs (Figure 1), using the scaled training data `X_train_scaled` and its corresponding `y_train labels`. During training, the model also evaluated its performance on the validation data `X_test_scaled` and `y_test` to measure its generalization ability. The training history (such as loss and metrics) was stored in the history variable for further analysis (see archive in the Mendeley repository). To avoid overfitting, which occurs when a model learns the noise in the training data instead of the actual pattern, `dropout` was used. Thus, the summary of the model is shown in Table 2.

Table 2. Summary of the model structure.

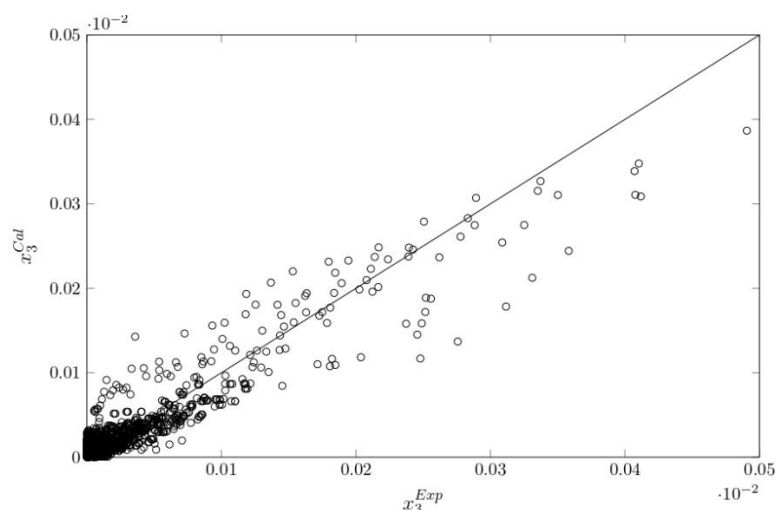
Layer (type)	Output Shape	Param #
dense (Dense)	(None, 128)	8576
dense_1 (Dense)	(None, 128)	16512
dropout (Dropout)	(None, 128)	0
dense_2 (Dense)	(None, 64)	8256
dense_3 (Dense)	(None, 1)	65

Total params: 100,229 (391.52 KB), Trainable params: 33,409 (130.50 KB), Non-trainable params: 0 (0.00 B), Optimizer params: 66,820 (261.02 KB).

One of the most important parameters in evaluating an AI algorithm is the loss function, also called the error function because it quantifies the difference between the predicted results of an AI algorithm and the actual target values. Thus, in the regression problem of predicting solubility data from reported data, the loss function evaluates the prediction of the neural network from the training sample of the training data set. Thus, the loss function quantifies the difference or error between the network's predicted solubility and the reported solubility data. When evaluating the loss of the model using the code line `print(f'Loss: {results[0]}')` the value returned is very small $5.0740 \cdot 10^{-6}$. This indicates that the model has done a good job since the loss is close to zero, as for the mean absolute error, a value of 0.0013 was obtained, which is the average of the error in the model predictions, reflecting that the model makes a very small error in its predictions.

Figure 2 shows the correlation between the experimental data and those computed by the AI algorithm; the computed data shows an acceptable correlation ($r^2=0.86$), although the mean absolute error is very low; therefore, it is possible that compensation processes are occurring that lead to low absolute errors.

A disadvantage discussed by many authors is the inability to correlate the results with specific physicochemical properties, since the AI algorithms relate the variables to each other and use statistics to measure the correlation between the different characteristics of the data. Therefore, it doesn't allow to show clearly the energy relations that would allow to rationalize the results from a physicochemical point of view, as it is the case when using mathematical models such as van't Hoff, Yalkowsky-Roseman-van't Hoff, Apelblat, Buchowski-Ksiazczak λh , Yaws, NRTL, Wilson and modified Wilson [11, 95-100]. However, despite these drawbacks, the results show that the IA algorithm can be a good approximation tool for optimizing solubility-related processes in the pharmaceutical industry.

**Figure 2.** Experimental solubility data versus predicted solubility.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors have no conflict of interest.

REFERENCES

1. A.N. Martin, P. Bustamante & A.H.C. Chun. *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (PA), 1993.
2. J.H. Blanco-Márquez, Y.A. Quigua-Medina, J.D. García-Murillo, J.K. Castro-Camacho, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis and applications of the Abraham solvation parameter model in the study of the solubility of some sulfonamides. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(1), 234–255 (2020). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.87038>
3. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, M. Herrera & D.R. Delgado. Numerical analysis of sulfamerazine solubility in acetonitrile + 1-propanol cosolvent mixtures at different temperatures. *Sustainability* (Basel), **15**(8), 6596 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/SU15086596>
4. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, M. Herrera, & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis of the solubility of propylparaben in acetonitrile–water cosolvent mixtures. *Sustainability* (Basel), **15**(6), 4795 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/SU15064795>
5. M. Khoubnasabjafari, D.R. Delgado, F. Martinez, A. Jouyban & W.E. Acree. Predicting the solubility, thermodynamic properties and preferential solvation of sulphamethazine in {acetonitrile + water} mixtures using a minimum number of experimental data points. *Phys. Chem. Liq.*, **59**(3), 400–411 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2020.1731812>
6. N. Jain & S.H. Yalkowsky. Estimation of the aqueous solubility I: Application to organic nonelectrolytes. *J. Pharm. Sci.*, **90**(2), 234–252 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200102\)90:2<234::aid-jps14>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200102)90:2<234::aid-jps14>3.0.co;2-v)
7. S.H. Yalkowsky, Y. He & P. Jain. *Handbook of Aqueous Solubility Data*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton (FL), 2016. Doi: <https://doi.org/10.1201/ebk1439802458>
8. R. Kuhne, R.-U. Ebert, F. Kleint, G. Schmidt & G. Schuurmann. Group contribution methods to estimate water solubility of organic chemicals. *Chemosphere*, **30**(11), 2061–2077 (1995). Doi: [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00084-L](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00084-L)
9. A. Fredenslund, R.L. Jones & J.M. Prausnitz. Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. *AIChE J.*, **21**(6), 1086–1099 (1975). Doi: <https://doi.org/10.1002/AIC.690210607>
10. D.J.W. Grant, M. Mehdizadeh, A.H.L. Chow & J.E. Fairbrother. Non-linear van't Hoff solubility-temperature plots and their pharmaceutical interpretation. *Int. J. Pharm.*, **18**(1-2), 25–38 (1984). Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(84\)90104-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(84)90104-2)
11. A. Martin, P.L. Wu, A. Adjei, R.E. Lindstrom & P.H. Elworthy. Extended Hildebrand solubility approach and the log linear solubility equation. *J. Pharm. Sci.*, **71**(8) 849–856 (1982). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600710803>
12. D.M. Cristancho, D.R. Delgado & F. Martínez. Meloxicam solubility in ethanol+water mixtures according to the extended Hildebrand solubility approach. *J. Solution Chem.*, **42**, 1706–1716 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10953-013-0058-y>
13. J.H. Hildebrand. A criticism of the term “hydrophobic bond”. *J. Phys. Chem.*, **72**(5), 1841–1842 (1968). Doi: <https://doi.org/10.1021/j100851a092>
14. W. Weibull. A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mechan.*, **18**(3), 293–297 (1951). Doi: <https://doi.org/10.1115/1.4010337>
15. M. Svärd & Å.C. Rasmuson. (Solid + liquid) solubility of organic compounds in organic solvents – Correlation and extrapolation. *J. Chem. Thermodyn.*, **76**, 124–133 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.03.013>

16. H. Buchowski, A. Ksiazczak & S. Pietrzyk. Solvent activity along a saturation line and solubility of hydrogen-bonding solids. *J. Phys. Chem.*, **84**(9), 975–979 (1980). Doi: <https://doi.org/10.1021/J100446A008>
17. R.T. Hardman & J.R. Partington. CXCIX.—An application of Kirchhoff's equation to solutions. (A contribution to the thermodynamic theory of solubility.). *J. Chem. Soc., Trans.*, **99**, 1769–1775 (1911). Doi: <https://doi.org/10.1039/ct9119901769>
18. S. Jin, X. Cui, Y. Qi, Y. Shen & H. Li. Measurement and correlation of the solubility of β -cyclodextrin in different solutions at different temperatures and thermodynamic study of the dissolution process. *Processes*, **7**(3), 135 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/pr7030135>
19. B.S. Liu, J.B. Gong, J.K. Wang & C.Y. Jia. Solubility of potassium clavulanate in ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propanol, and 2-methyl-1-propanol between 273 K and 305 K. *J. Chem. Eng. Data*, **50**(5), 1684–1686 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1021/JE050145R>
20. J.M. Prausnitz, R.N. Lichtenthaler & E. Gomes de Azevedo. *Termodinamica Molecular de los Equilibrios de Fases*, 3rd ed. Prentice Hall, Madrid, 2000.
21. J.W. McCargar, A.I. Zvaigzne & I.L. Teng. Mathematical representation of thermodynamic properties. Carbazole solubilities in binary alkane + dibutyl ether and alkane + tetrahydropyran solvent mixtures. *Phys. Chem. Liq.*, **23**(1), 27–35 (1991). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319109108030630>
22. A. Torres-Cardozo, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, J. Osorio-Gallego, R.E. Cardenas-Torres, F. Angarita-Reina, F. Martinez & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis of the solubility of progesterone in 1-octanol + ethanol cosolvent mixtures at different temperatures. *Alexandria Eng. J.*, **64**, 219–235 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.AEJ.2022.08.035>
23. X. Yu, X. Wang, H. Wang, X. Li & J. Gao. Prediction of solubility parameters for polymers by a QSPR model. *QSAR Comb. Sci.*, **25**(2) 156–161 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1002/qsar.200530138>
24. P.R. Duchowicz & E.A. Castro. QSPR studies on aqueous solubilities of drug-like compounds. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**(6), 2558–2577 (2009). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10062558>
25. A. Lusci, G. Pollastri & P. Baldi. Deep architectures and deep learning in chemoinformatics: The prediction of aqueous solubility for drug-like molecules. *J. Chem. Inf. Model.*, **53**(7) 1563–1575 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1021/ci400187y>
26. A. Llinas & A. Avdeef. Solubility challenge revisited after ten years, with multilab shake-flask data, using tight (SD ~ 0.17 log) and loose (SD ~ 0.62 log) test sets. *J. Chem. Inf. Model.*, **59**(6), 3036–3040 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00345>
27. A. Llinàs, R.C. Glen & J.M. Goodman. Solubility challenge: Can you predict solubilities of 32 molecules using a database of 100 reliable measurements?, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**(7), 1289–1303 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1021/ci800058v>
28. S.H. Yalkowsky. *Solubility and Solubilization in Aqueous Media*. American Chemical Society, Washington D.C., 1999.
29. S.H. Yalkowsky & D.S. Mishra. Ideal solubility of a solid solute: Effect of heat capacity assumptions. *Pharm. Res.*, **9**(7), 958–959 (1992). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015873521067>
30. S.H. Yalkowsky & R. Pinal. Estimation of the aqueous solubility of complex organic molecules. *Chemosphere*, **26**(7), 1239–1261 (1993). Doi: [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90179-9](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90179-9)
31. R.E. Skyner, J.L. McDonagh, C.R. Groom, T. Van Mourik & J.B.O. Mitchell. A review of methods for the calculation of solution free energies and the modelling of systems in solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 6174–6191 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1039/c5cp00288e>
32. D.S. Palmer, N.M. O'Boyle, R.C. Glen & J.B.O. Mitchell. Random forest models to predict aqueous solubility. *J. Chem. Inf. Model.*, **47**(1) 150–158 (2007). Doi : <https://doi.org/10.1021/ci060164k>
33. C. Rudin. Stop explaining black box machine learning models for high stakes decisions and use interpretable models instead. *Nature Machine Intelligence*, **1**, 206–215 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1038/s42256-019-0048-x>
34. S. Boobier, D.R.J. Hose, A.J. Blacker & B.N. Nguyen. Machine learning with physicochemical relationships: Solubility prediction in organic solvents and water. *Nature Commun.*, **11**, 5744 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19594-z>

35. C.A.M. Ortiz, N.E. Cerquera, J.K.C. Camacho, J.O. Gallego, R.E.C. Torres, M. Herrera & D.R. Delgado. Preferential solvation of triclocarban in N-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures according to the Inverse Kirkwood-Buff Integrals (IKBI) method and correlation of solubility by means of some mathematical models. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **53**(1), 219–243 (2024). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.111422>
 36. D.R. Delgado, R.E. Cardenas-Torres & C.P. Ortiz. Mathematical modeling of the aqueous solubility of bioactive substances of environmental interest. *Proceedings - 2022 8th International Engineering, Sciences and Technology Conference (IESTEC)*, Panama, Panama, pp. 498–503. Doi: <https://doi.org/10.1109/iestec54539.2022.00084>
 37. D.R. Delgado & F. Martínez. Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method. *J. Mol. Liq.*, **193**, 152–159 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.12.021>
 38. D.R. Delgado & F. Martínez. Solution thermodynamics of sulfadiazine in some ethanol + water mixtures. *J. Mol. Liq.*, **187**, 99–105 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.06.011>
 39. D.R. Delgado & F. Martínez. Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol + water mixtures at several temperatures. *Fluid Phase Equilib.*, **379**, 128–138 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.07.013>
 40. D.R. Delgado, O. Bahamón-Hernandez, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, F. Martínez, E. Rahimpour, A. Jouyban & W.E. Acree. Solubility of sulfadiazine in (acetonitrile + methanol) mixtures: Determination, correlation, dissolution thermodynamics and preferential solvation. *J. Mol. Liq.*, **322**, 114979 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114979>
 41. D.M. Jiménez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado, M.A. Peña & F. Martínez. Solubility temperature dependence and preferential solvation of sulfadiazine in 1,4-dioxane + water co-solvent mixtures. *Fluid Phase Equilib.*, **397**, 26–36 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.03.046>
 42. M.d.M. Muñoz, D.R. Delgado, M.Á. Peña, A. Jouyban & F. Martínez. Solubility and preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in propylene glycol + water mixtures at 298.15 K. *J. Mol. Liq.*, **204**, 132–136 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.01.047>
 43. A.M. Cruz-González, M.S. Vargas-Santana, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, F. Martínez, A. Jouyban & W.E. Acree. Solubility of sulfadiazine in (ethylene glycol + water) mixtures: Measurement, correlation, thermodynamics and preferential solvation. *J. Mol. Liq.*, **323**, 115058 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115058>
 44. C.F. Trujillo-Trujillo, F. Angarita-Reina, M. Herrera, C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, F. Martinez & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis of the solubility of sulfadiazine in (acetonitrile + 1-propanol) cosolvent mixtures from 278.15 K to 318.15 K. *Liquids*, **3**(1), 7–18 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/liquids3010002>
 45. D.R. Delgado, C.P. Ortiz, F. Martínez & A. Jouyban. Equilibrium solubility of sulfadiazine in (acetonitrile + ethanol) mixtures: Determination, correlation, dissolution thermodynamics, and preferential solvation. *Int. J. Thermophys.*, **45**, 129 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10765-024-03405-4>
 46. M.S. Vargas-Santana, A.M. Cruz-González, N.E. Cerquera, A.S.E. Rodriguez, R.E. Cardenas, O. Calderón-Losada, C.P. Ortiz & D.R. Delgado. Extended Hildebrand solubility approach and Yalkowsky-Roseman model for estimating the solubility of sulfadiazine and sulfamethazine in some {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 812–836 (2022). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n3.100240>
 47. D.R. Delgado & F. Martínez. Solubility and solution thermodynamics of some sulfonamides in 1-propanol + water mixtures. *J. Solution Chem.*, **43**, 836–852 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10953-014-0169-0>
 48. D.R. Delgado & F. Martínez. Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamerazine in methanol + water mixtures. *J. Solution Chem.*, **44**, 360–377 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10953-015-0317-1>
 49. D.R. Delgado & F. Martínez. Solubility and solution thermodynamics of sulfamerazine and sulfamethazine in some ethanol + water mixtures. *Fluid Phase Equilib.*, **360**, 88–96 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.09.018>
-

50. M.S. Vargas-Santana, A.M. Cruz-González, C.P. Ortiz, D.R. Delgado, F. Martínez, M.Á. Peña, W.E. Acree & A. Jouyban. Solubility of sulfamerazine in (ethylene glycol + water) mixtures: Measurement, correlation, dissolution thermodynamics and preferential solvation. *J. Mol. Liq.*, **337**, 116330 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116330>
51. R.E. Cárdenas-Torres, C.P. Ortiz, W.E. Acree, A. Jouyban, F. Martínez & D.R. Delgado. Thermodynamic study and preferential solvation of sulfamerazine in acetonitrile + methanol cosolvent mixtures at different temperatures. *J. Mol. Liq.*, **349**, 118172 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118172>
52. J.H. Blanco-Márquez, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, F. Martínez, A. Jouyban & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis of the solubility and preferential solvation of sulfamerazine in (acetonitrile + water) cosolvent mixtures at different temperatures. *J. Mol. Liq.*, **293**, 111507 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111507>
53. J. Tovar-Amézquita, C. Rincón-Guio, F.E. Torres-Suarez, M.M. Florez, C.P. Ortiz, F. Martinez & D.R. Delgado. Thermodynamic assessment of the pyrazinamide dissolution process in some organic solvents. *Molecules*, **29**(21), 5089 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules29215089>
54. D.R. Delgado, O.A. Almanza, F. Martínez, M.A. Peña, A. Jouyban & W.E. Acree. Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures. *J. Chem. Thermodyn.*, **97**, 264–276 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.02.002>
55. A. Aydi, C.P. Ortiz, D.I. Caviedes-Rubio, C. Ayadi, S. Hbaieb & D.R. Delgado. Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in ethylene glycol + water mixtures. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **118**, 68–77 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2020.12.031>
56. J.H. Blanco-Márquez, D.I. Caviedes Rubio, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, F. Martínez & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis and preferential solvation of sulfamethazine in acetonitrile + water cosolvent mixtures. *Fluid Phase Equilib.*, **505**, 112361 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112361>
57. D.R. Delgado, J.K. Castro-Camacho, C.P. Ortiz, D.I. Caviedes-Rubio & F. Martinez. Dissolution thermodynamics of the solubility of sulfamethazine in (acetonitrile + 1-propanol) mixtures. *Pharmaceuticals*, **17**(12), 1594 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph17121594>
58. P. Bustamante, R. Ochoa, A. Reillo & J.B. Escalera. Chameleonic effect of sulfanilamide and sulfamethazine in solvent mixtures. solubility curves with two maxima. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(5), 1129–1133 (1994). Doi: <https://doi.org/10.1248/cpb.42.1129>
59. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, F. Martínez & D.R. Delgado. Solubility of sulfamethazine in the binary mixture of acetonitrile + methanol from 278.15 to 318.15 K: Measurement, dissolution thermodynamics, preferential solvation, and correlation. *Molecules*, **26**(24), 7588 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26247588>
60. I.P. Osorio, F. Martínez, D.R. Delgado, A. Jouyban & W.E. Acree. Solubility of sulfacetamide in aqueous propylene glycol mixtures: Measurement, correlation, dissolution thermodynamics, preferential solvation and solute volumetric contribution at saturation. *J. Mol. Liq.*, **297**, 111889 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111889>
61. S.G. Johnsen. A review of experimental solubilities and a general correlation between the temperature-dependent solubility and solute and solvent molar masses for binary n-alkane mixtures. *Fluid Phase Equilib.*, **556**, 113380 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2022.113380>
62. J. Tolls, J. Van Dijk, E.J.M. Verbruggen, J.L.M. Hermens, B. Loeprecht & G. Schüürmann. Aqueous solubility-molecular size relationships: A mechanistic case study using C10- to C19-alkanes. *J. Phys. Chem. A*, **106**(11), 2760–2765 (2002). Doi: <https://doi.org/10.1021/jp011755a>
63. D.R. Delgado, G.A. Rodríguez & F. Martínez. Thermodynamic study of the solubility of sulfapyridine in some ethanol + water mixtures. *J. Mol. Liq.*, **177**, 156–161 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.001>
64. J.H. Hildebrand. Solubility. XII. Regular solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **51**(1), 66–80 (1929). Doi: <https://doi.org/10.1021/ja01376a009>

65. Y. Gong, D.J.W. Grant & H.G. Brittain. Principles of Solubility. In: P. Augustijns, M.E. Brewster (editors), *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*. Springer, New York (NY), 2007; pp. 1–27. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69154-1_1
66. S.H. Neau, S.V. Bhandarkar & E.W. Hellmuth. Differential molar heat capacities to test ideal solubility estimations. *Pharm. Res.*, **14**, (1997) 601–605 (1997). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1012148910975>
67. T.M. Letcher & R. Battino. An introduction to the understanding of solubility. *J. Chem. Educ.*, **78**(1), 103–111 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1021/ed078p103>
68. M.A. Parra, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, R.E. Cárdenas-Torres, D.R. Delgado, M.Á. Peña & F. Martínez. Solubility of ciprofloxacin in different solvents at several temperatures: Measurement, correlation, thermodynamics and Hansen solubility parameters. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **150**, 105028 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105028>
69. M. Rojas-Motta, J.E. Rojas-Motta, J.L. Diaz-Jimenez, F.A. Bahos-Narváez, J.H. Blanco-Márquez, C.P. Ortiz, D.R. Delgado, M. Rojas-Motta, J.E. Rojas-Motta, J.L. Diaz-Jimenez, F.A. Bahos-Narváez, J.H. Blanco-Márquez, C.P. Ortiz & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis and preferential solvation of gatifloxacin in DMF + methanol cosolvent mixtures. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(3), 675–698 (2020). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91337>
70. D.A. Rivas-Ozuna, C.P. Ortiz, D.R. Delgado & F. Martínez. Solubility and preferential solvation of pyrazinamide in some aqueous-cosolvent mixtures at 298.15 K. *Int. J. Thermophys.*, **45**, 39 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10765-023-03318-8>
71. A.M. Cruz-González, M.S. Vargas-Santana, S.d.J. Polania-Orozco, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, F. Martínez, D.R. Delgado, A. Jouyban & W.E. Acree. Thermodynamic analysis of the solubility of triclocarban in ethylene glycol + water mixtures. *J. Mol. Liq.*, **325**, 115222 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115222>
72. D.I. Caviedes-Rubio, C.P. Ortiz, F. Martinez & D.R. Delgado. Thermodynamic assessment of triclocarban dissolution process in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures. *Molecules*, **28**(20), 7216 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28207216>
73. C.P. Ortiz, D.I. Caviedes-Rubio, F. Martinez & D.R. Delgado. Solubility of sulfamerazine in acetonitrile + ethanol cosolvent mixtures: Thermodynamics and modeling. *Molecules*, **29**(22), 5294 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules29225294>
74. R. Gani. Group contribution-based property estimation methods: advances and perspectives. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, **23**, 184–196 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.04.007>
75. Y. Sun & N.V. Sahinidis. A new functional group selection method for group contribution models and its application in the design of electronics cooling fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **60**(19), 7291–7300 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c00796>
76. R. Al, J. Frutiger, A. Zubov & G. Sin. Prediction of environmental properties using a hybrid group contribution approach. *Comp. Aid. Chem. Eng.*, **44**, 1723–1728 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64241-7.50282-2>
77. S. Cignitti, L. Zhang & R. Gani. Computer-aided framework for design of pure, mixed and blended products. *Comp. Aid. Chem. Eng.*, **37**, 2093–2098 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63576-1.50043-1>
78. G.A.d.M. Areiza-Aldana, A. Cuellar-Lozano, N.A. Peña-Carmona, D.I. Caviedes-Rubio, A. Mehrdad, A.H. Miri, G.A. Rodríguez-Rodríguez & D.R. Delgado. Solution thermodynamics and preferential solvation of 3-chloro-*N*-phenyl-phthalimide in acetone + methanol mixtures. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), (2016) 256–274 (2016). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n2.59941>
79. J.J. Sandoval-Castro, C.P. Ortiz, J.D. Rodríguez-Rubiano, G.A. Rodríguez-Rodríguez & D.R. Delgado. Preferential solvation of triclin in {ethanol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(2) 135–148 (2018). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n2.73933>

80. A. Aydi, C. Ayadi, K. Ghachem, A.Z. Al-Khazaal, D.R. Delgado, M. Alnaief & L. Kolsi. Solubility, solution thermodynamics, and preferential solvation of amygdalin in ethanol + water solvent mixtures. *Pharmaceuticals*, **13**(11), 395 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph13110395>
81. J.J. Agredo-Collazos, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, R.E. Cardenas-Torres, D.R. Delgado, M.Á. Peña & F. Martínez. Equilibrium solubility of tridocarb in (cyclohexane + 1,4-dioxane) mixtures: Determination, correlation, thermodynamics and preferential solvation. *J. Solution Chem.*, **51**, 1603–1625 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10953-022-01209-4>
82. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, D.I. Caviedes-Rubio, S.D.J. Polania-Orozco & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis and preferential solvation of sulfanilamide in different cosolvent mixtures. *Phys. Chem. Liq.*, **60**(1), 9–24 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2021.1888382>
83. D.P. Pacheco & F. Martínez. Thermodynamic analysis of the solubility of naproxen in ethanol + water cosolvent mixtures. *Phys. Chem. Liq.*, **45**(5) 581–595 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319100701313862>
84. F. Martínez, M.Á. Peña & P. Bustamante. Thermodynamic analysis and enthalpy-entropy compensation for the solubility of indomethacin in aqueous and non-aqueous mixtures. *Fluid Phase Equilib.*, **308**(1-2), 98–106 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.06.016>
85. H. Rezaei, E. Rahimpour, F. Martinez & A. Jouyban. Solubility determination and thermodynamic modeling of deferiprone in the binary aqueous mixtures of 2-propanol from 293.15 to 313.15 K. *Iranian J. Pharm. Sci.*, **19**(4) 279–292 (2023). Doi: <https://doi.org/10.22037/ijps.v19i4.43600>
86. M. Barzegar-Jalali, A. Sheikhi-Sovari, F. Martinez, B. Seyfinejad, E. Rahimpour & A. Jouyban. Solubility determination, mathematical modeling, and thermodynamic analysis of naproxen in binary solvent mixtures of (1-propanol/2-propanol) and ethylene glycol at different temperatures. *BMC Chem.*, **18**, 178 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1186/S13065-024-01291-3>
87. E. Mohammadian, M. Dashti, F. Martinez & A. Jouyban. Experimental measurement, thermodynamic analysis, and mathematical modeling for budesonide solubility in 1-propanol + water mixtures at $T = (293.2 \text{ to } 313.2) \text{ K}$. *BMC Chem.*, **18**, 190 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1186/S13065-024-01297-X>
88. D. Baracaldo-Santamaría, C.A. Calderon-Ospina, C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, F. Martinez & D.R. Delgado. Thermodynamic analysis of the solubility of isoniazid in (PEG 200 + water) cosolvent mixtures from 278.15 K to 318.15 K. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(17), 10190 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms231710190>
89. F. Martínez, M.Á. Peña & A. Jouyban. Dissolution thermodynamics and preferential solvation of phenothiazine in some aqueous cosolvent systems. *Liquids*, **4**(2), 443–455 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/liquids4020024>
90. P. Bustamante, A. Martin & M.A. Gonzalez-Guisandez. Partial solubility parameters and solvatochromic parameters for predicting the solubility of single and multiple drugs in individual solvents. *J. Pharm. Sci.*, **82**(6), 635–640 (1993). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600820618>
91. P. Bustamante, J. Navarro, S. Romero & B. Escalera. Thermodynamic origin of the solubility profile of drugs showing one or two maxima against the polarity of aqueous and nonaqueous mixtures: Niflumic acid and caffeine. *J. Pharm. Sci.*, **91**(3), 874–883 (2002). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.10076>
92. P. Bustamante & E. Sellés. Relationship between the solubility parameter and the binding of drugs by plasma proteins. *J. Pharm. Sci.*, **75**(7), 639–643 (1986). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600750704>
93. D.R. Delgado. Solubility data of some sulfonamides in different cosolvent mixtures. Mendeley Data, Medellin, 2024. Doi: <https://doi.org/10.17632/2vxv7hzsrn>
94. D.R. Delgado & R.E. Cardenas-Torres. AI-Solubility algorithm. Mendeley Data, Medellin, 2024. Doi: <https://doi.org/10.17632/yg58dn8b9c>
95. R.G. Sotomayor, A.R. Holguín, D.M. Cristancho, D.R. Delgado & F. Martínez. Extended Hildebrand Solubility Approach applied to piroxicam in ethanol + water mixtures. *J. Mol. Liq.*, **180**, (2013) 34–38 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.12.028>
96. J.L. Gómez, G.A. Rodríguez, D.M. Cristancho, D.R. Delgado, C.P. Mora, A. Yurquina & F. Martínez. Extended Hildebrand Solubility Approach applied to nimodipine in PEG 400 + ethanol mixtures.

- Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**(1), 103–121 (2013). URL: <http://scielo.org.co/pdf/rccqf/v42n1/v42n1a07.pdf>
97. A.R. Holguín, D.R. Delgado & F. Martínez. Indomethacin solubility in propylene glycol + water mixtures according to the Extended Hildebrand solubility approach. *Lat. Am. J. Pharm.*, **31**(5), 720–726 (2012). URL: https://www.latamjpharm.org/resumenes/31/5/LAJOP_31_5_1_12.pdf
98. Z.J. Cárdenas, D.M. Jiménez, D.R. Delgado, M. Peña & F. Martínez. Extended Hildebrand solubility approach applied to some sulphonamides in propylene glycol + water mixtures. *Phys. Chem. Liq.*, **53**(6), 763–775 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2015.1048247>
99. A. Aydi, I. Dali, K. Ghachem, A.Z. Al-Khazaal, D.R. Delgado & L. Kolsi. Solubility of Hydroxytyrosol in binary mixture of ethanol + water from (293.15 to 318.15) K: Measurement, correlation, dissolution thermodynamics and preferential solvation. *Alexandria Eng. J.*, **60**(1), 905–914 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2020.10.019>
100. Y.L. Cuellar-Carmona, N.E. Cerquera, R.E. Cardenas-Torres, C.P. Ortiz, F. Martínez & D.R. Delgado. Correlation of the solubility of isoniazid in some aqueous cosolvent mixtures using different mathematical models. *Braz. J. Chem. Eng.* (2024). Doi: <https://doi.org/10.1007/S43153-024-00489-1>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

N.Y. Echeagaray-Solorza, Y. Díaz-Romero, L.G. Tobón-Galicia & S. Tejada-Paniagua. Predicting drug solubility in cosolvent systems using artificial intelligence algorithms. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **54**(1), 131–144 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119553>

Review article

Incorrect determination of lower limit of quantification (LLOQ) of analytical methods

Ali Shayanfar^{1,2*} & Saba Rastgoo^{3,4}

¹Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

²Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

³Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

⁴Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

*Corresponding author, E-mail: shayanfara@tbzmed.ac.ir

Received: November 23, 2024

Corrected: January 23, 2025

Accepted: January 27, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117696>

SUMMARY

Objectives: Generally, a new analytical method for publication in a scientific journal should report some parameters to claim that the technique has acceptable validity and sensitivity in contrast to other methods. The most commonly reported parameters are limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and lower limit of quantification (LLOQ). Recently, LLOQ was selected by researchers to show the lowest concentration level that can be determined. Based on the FDA's guidelines, some criteria should be considered in reporting LLOQ. **Methods:** In this study, previously reported analytical methods were investigated to check if they considered FDA's criteria (relative standard deviation of LLOQ, signal-to-noise, and back-calculated error for LLOQ). Besides the FDA guideline's criteria, the established criteria based on the calibration curve equation and the linear range were calculated to confirm the validity of the reported LLOQ. **Results:** Analysis of data indicates that the most LLOQ values are not defined based on FDA guidelines, and they do not show the correct sensitivity value of the reported analytical method. **Conclusions:** Considering the all of the recommended criteria for LLOQ are necessary to correct determination of sensitivity and linear range of analytical methods.

Keywords: Analytical method; FDA; LLOQ; LOD; LOQ

RESUMEN

Determinación incorrecta del límite inferior de cuantificación (LIDC) de los métodos analíticos

Objetivos: Generalmente, un nuevo método analítico para publicación en una revista científica debe reportar algunos parámetros para afirmar que la técnica tiene una validez y sensibilidad aceptables en contraste con otros métodos. Los parámetros informados con mayor frecuencia son el límite de detección (LDD), el límite de cuantificación (LDC) y el límite inferior de cuantificación (LIDC). Recientemente, los investigadores seleccionaron LIDC para mostrar el nivel de concentración más bajo que se puede determinar. Según las pautas de la FDA, se deben tener en cuenta algunos criterios al informar el LIDC. **Métodos:** En este estudio, se investigaron los métodos analíticos informados previamente para verificar si consideraban los criterios de la FDA (desviación estándar relativa del LIDC, relación señal-ruido y error retrocalculado para el LIDC). Además de los criterios de las directrices de la FDA, se calcularon los criterios establecidos basados en la ecuación de la curva de calibración y el rango lineal para

confirmar la validez del LIDC informado. **Resultados:** El análisis de datos indica que la mayoría de los valores LIDC no están definidos según las pautas de la FDA y no muestran el valor de sensibilidad correcto del método analítico informado. **Conclusiones:** Considerando que todos los criterios recomendados para LIDC son necesarios para la correcta determinación de la sensibilidad y rango lineal de los métodos analíticos.

Palabras clave: Método analítico; Administración de Alimentos y Medicamentos; LIDC; LDD; LDC

RESUMO

Determinação incorreta do limite inferior de quantificação (LIDQ) dos métodos analíticos

Objetivos: Geralmente, um novo método analítico para publicação em um periódico científico deve relatar alguns parâmetros para afirmar que a técnica tem validade e sensibilidade aceitável em contraste com outros métodos. Os parâmetros mais comumente relatados são limite de detecção (LDD), limite de quantificação (LDQ) e limite inferior de quantificação (LIDQ). Recentemente, o LIDQ foi selecionado por pesquisadores para mostrar o menor nível de concentração que pode ser determinado. Com base nas diretrizes do FDA, alguns critérios devem ser considerados ao relatar o LIDQ. **Métodos:** Neste estudo, métodos analíticos relatados anteriormente foram investigados para verificar se eles consideravam os critérios do FDA (desvio padrão relativo do LIDQ, relação sinal-ruído e erro retrocalculado para LIDQ). Além dos critérios da diretriz da FDA, os critérios estabelecidos com base na equação da curva de calibração e na faixa linear foram calculados para confirmar a validade do LIDQ relatado. **Resultados:** A análise dos dados indica que a maioria dos valores de LIDQ não são definidos com base nas diretrizes do FDA e não mostram o valor de sensibilidade correto do método analítico relatado. **Conclusões:** Considerando todos os critérios recomendados para LIDQ, é necessário determinar corretamente a sensibilidade e a faixa linear dos métodos analíticos.

Palavras-chave: Método analítico; FDA; LIDQ; LDD; LDQ

1. INTRODUCTION

The lowest concentration level that can be reliably quantified is the most common parameter of an analytical method for. In the most of published articles, this value was compared with previous analytical techniques to confirm better sensitivity. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) [1] and lower limit of quantification (LLOQ) [2, 3] are currently used in determining the sensitivity of the analytical method and calculated based on the calibration curve.

LOD and LOQ are classic parameters to determine the minimum concentration of an analyte that can be detected and quantified, respectively. Generally, three and ten folds of standard deviation divided by slope were used for the determination of LOD and LOQ, respectively. However, various methods were proposed for the calculation of standard deviation of an analytical method i.e. standard deviations of the blank, calibration curve and intercept. Therefore, significantly different numerical values of LOD and LOQ are obtained for the same analytical method [4, 5].

FDA proposed an alternative parameter for LOD and LOQ which is named LLOQ. LLOQ looks like is simple parameter and it is the lower limit of a calibration curve. Especially in the established method based on spectroscopy techniques and complex matrix e.g. biological samples, LLOQ was proposed as an alternative parameter [4]. However, the correct determination of LLOQ is a challenging issue. It is suggested by the FDA and the method for its determination has some criteria which are described in the method section.

Based on previous studies, some of the reported calibration ranges were not determined correctly by researchers and a new parameter which named “ratio” for validity evaluation of analytical was proposed by our group. Incorrect determination of calibration curve gives false LLOQ value and application of established analytical method for quantification of an analyte is not correct [6].

In this study, published articles which “LLOQ” was available in the abstract of the articles were chosen from the Scopus database. The articles which have no appropriate information were excluded. Then, the selected article was investigated from the viewpoint of considering LLOQ criteria and the results have been discussed. In addition, “ratio” as a main parameter to check the validity of the analytical method was reported.

2. METHODS

The Scopus database was used for collecting articles. LLOQ in the abstract of published articles in 2021 was selected as a keyword. In the first step, reported LLOQ, linear range, and linear regression equation data of reported analytical methods were collected and listed in Table 1. From selected articles, 185 analytical methods from 66 articles that reported all of the data were recorded. In the next step, we checked if the LLOQs had been reported under the required condition or not. Determination criteria for LLOQ were evaluated based on FDA’s guidelines as follows [7]:

1. Signal/noise=5
2. The relative standard deviation (RSD) of LLOQ should be less than 20%.
3. The back-calculated error for LLOQ should be less than 20%.

In addition, the reported parameter for evaluation accuracy of linear range based on the upper limit of the calibration curve (ULOQ) and LLOQ which was reported in previous work, was calculated as follows:

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{calculated response for ULOQ}/\text{calculated response for LLOQ})}{(\text{ULOQ}/\text{LLOQ})}$$

In an ideal situation, the ratio should be 1; the ratio between 0.5 and 1.5 was considered correct and valid LLOQ and linear range [6].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 lists details of studied analytical methods for evaluating the applied technique for the determination of LLOQ. Generally, the lower limit of the calibration curve in all articles was declared as LLOQ without the details of the FDA’s criteria. Signal/noise=5 and RSD value for LLOQ < 20% are the main criteria which did not mention in the determination of LLOQ. The calculated “ratio” of each method indicates that only 54% of methods have a numerical value between 0.5-1.5. This issue confirms the importance of all criteria for LLOQ determination in developing analytical methods and this issue should be considered by editors and reviewers of journals. A considerable issue is observed in the obtained ratios for the developed methods for the analysis of dexamethasone in various matrices (2, 1.27 and 1.63 in plasma, retina, and vitreous, respectively). It confirms the importance of the matrix effect in developing an analytical method.

In some reported cases in international journals, lower limit of calibration curve based R² value was determined as LLOQ while the intercept value of calibration curve is high [4] and

give negative values for back-calculated concentration (Figure 1). In addition, a bar chart instead of a scatter plot was applied for plotting a calibration curve while in a bar chart continuous values were inserted in the X-axis [8]. In some cases, the logarithm of concentration was used for plotting a calibration curve without considering back-calculated concentration based on the regression equation of calibration [9]. These errors in developing an analytical method and determination of linear range show the importance of reporting data of calibration curve and considering FDA criteria in reporting an analytical method. Various methods were applied for sensitivity determination of an analytical method, and as we highlighted in this article, the principal criteria were not considered in reporting LLOQ. In some studies, only one criterion i.e., 5-fold signal-to-noise ratio was applied to the calculation of LLOQ. In these articles, LLOQ values are exactly half of LOQ [10]. Surprisingly, in most articles, the analytical methods are compared together without considering these issues. Defined "ratio" in previous work which applied in this study is a valuable technique for evaluating the accuracy of reported linear range. In addition, alternative statistical methods such as double logarithm of concentration and response which were proposed by Zhu [11] could be applied by researchers for extending linear range of an analytical method.

Table 1. Details of collected analytical methods, including linear ranges (ULOQ and LLOQ), calibration curve equations, and numerical values of the defined ratio.

Code	Analyte	LLOQ	ULOQ	unit	Slope	Intercept	Ref.	Ratio
1	10-O-vanilloylaucubin	2.5	250	ng/mL	0.00126	0.00521	[12]	0.38
2	11-deoxycortisol	1.3	250	ng/mL	0.15	-0.49	[13]	-0.65
3	11-hydroxy-Delta(9)-tetra-hydrocannabinol	0.2	100	ng/mL	0.0293	0.0001	[14]	0.98
4	11-keto- β -boswellic acid	7.50	1500.00	ng/mL	0.0284	-0.3621	[15]	-1.42
5	17-hydroxyprogesterone	1.2	250	ng/mL	0.10	-0.33	[13]	-0.56
6	21-deoxycortisol	0.19	250	ng/mL	0.15	-0.46	[13]	-0.07
7	3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid	7.50	1500.00	ng/mL	0.1104	0.0967	[15]	0.90
8	6-Hydroxydexamethasone	0.1	100	ng/mL	0.512	-0.00307	[16]	1.06
9	Acetaminophen	10	500	ng/mL	0.00212	0.00521	[17]	0.81
10	Aconine	0.10	40.00	ng/mL	0.00322	0.00119	[15]	0.21
11	Adenosine diphosphate	0.1	20	μ g/mL	14.041	3.0471	[18]	0.32
12	Adenosine monophosphate	0.1	20	μ g/mL	28.864	7.0041	[18]	0.30
13	Adenosine triphosphate	0.1	20	μ g/mL	8.9019	1.6839	[18]	0.35
14	Agnuside	1	500	ng/mL	0.025	0.00614	[12]	0.80
15	Alanine	0.50	4120	ng/mL	140.2096	746.8086	[19]	0.09
16	Aldosterone	15	5000	pg/ml	1.088	-0.114	[20]	1.01
17	Aloperine	5	2000	ng/mL	0.46	0.0029	[21]	1.00
18	Ampicillin	0.25	200	μ g/mL	2.103	5.2332	[22]	0.09
19	Androstenedione	0.18	250	ng/mL	0.10	-0.29	[13]	-0.07
20	Angiotensin II	15	5000	pg/ml	0.896	-1.005	[20]	1.08
21	Arginine	1.94	3969	ng/mL	33.1698	293.494	[19]	0.18
22	Aristolochic acids I, mouse kidney	5.24	400	ng/mL	0.031	-0.065	[23]	1.66
23	Aristolochic acids I, mouse liver	4.62	400	ng/mL	0.028	-0.065	[23]	2.00

Incorrect determination of lower limit of quantification (LLOQ) of analytical methods

24	Aristolochic acids I, mouse serum	4.82	500	ng/mL	0.026	0.015	[23]	0.89
25	AS-358	1.02	500	ng/mL	0.00313	-0.0000453	[24]	1.01
26	Asenapine Maleate	0.1	14	µg/mL	36384	-656.84	[25]	1.22
27	Asparagine	2.46	5040	ng/mL	14.1428	27.9812	[19]	0.55
28	Aspartic acid	42.19	5400	ng/mL	4.9136	30.8616	[19]	0.87
29	Atractylenolide I	0.44	400.5	ng/mL	0.00290	-0.00119	[26]	14.82
30	Atractylenolide III	0.54	490.5	ng/mL	0.00439	0.22385	[26]	0.01
31	Atrovastatin	0.011	50.000	ng/patch	78710	6966	[27]	0.11
32	Avapritinib	2	4000	ng/mL	0.332162	0.132643	[28]	0.83
33	AYPTPLR-1	25	5000	mIU/mL	2822.08864	22166.46211	[29]	0.76
34	AYPTPLR-2	25	5000	mIU/mL	2326.43121	18774.36376	[29]	0.76
35	AYPTPLR-3	25	5000	mIU/mL	505.05598	6483.40981	[29]	0.66
36	Bezafibrate	0.022	50.000	ng/patch	120600	1737	[27]	0.60
37	Borneol	2	5000	ng/mL	0.0003	0.0005	[30]	0.55
38	Bornyl acetate	2	1000	ng/mL	0.0002	0.0024	[30]	0.14
39	Budesonide	0.05	10.00	µg/ ml	162376	-943.55	[31]	1.13
40	Budesonide	0.05	5.00	µg/ ml	165522	89.816	[31]	0.99
41	Buprenorphine	5	100	pg/µL	0.1249	-0.0517	[32]	1.09
42	Calycanthine	1.0	200	ng/mL	0.001748	-0.00763	[33]	-0.29
43	Camphor	2	10000	ng/mL	0.0005	0.0118	[30]	0.08
44	Cannabidiol	0.2	100	ng/mL	0.0420	-0.0018	[14]	1.27
45	Cannabinol	0.2	100	ng/mL	0.0973	-0.0016	[14]	1.09
46	Caryophyllene Oxide	2	5000	ng/mL	0.0001	0.0067	[30]	0.03
47	Casticin	0.5	50	ng/mL	0.00168	-0.000216	[12]	1.34
48	Cedazuridine	1	500	ng/mL	0.0061	0.1313	[34]	0.05
49	Chlorambucil	0.075	15.0	µg/mL	0.15501	0.00244	[35]	0.83
50	Ciprofibrate	0.032	50.000	ng/patch	29660	281.6	[27]	0.77
51	cis-4-GG-crocin	10.00	3200.00	ng/mL	0.000247568	0.000353532	[36]	0.88
52	Clofibrate	0.050	50.000	ng/patch	14830	2477	[27]	0.23
53	Codein	5	100	pg/µL	0.1316	-0.0790	[32]	1.13
54	Cortisol	0.49	250	ng/mL	0.12	-0.11	[13]	-1.14
55	Cortisol-D4	71.7	44017.8	pg/ml	0.00309	-0.1088	[37]	1.96
56	Cortisone-13C3	61.9	75555.2	pg/ml	0.00274	0.00552	[37]	0.97
57	Cotinine	6.00	336	ng/mL	0.00335	0.00283	[38]	0.88
58	Curzerene	10.16	325.0	ng/mL	0.0747	-0.0064	[39]	1.01
59	Cyanide, aqueous solution	0.05	5	µg/mL	1.6393	-0.231	[40]	-0.53
60	Cyanide, blood solution	0.1	5	µg/mL	0.698	-0.0331	[40]	1.88
61	Cysteine	2.21	4519	ng/mL	13.0453	-14.8464	[19]	2.06
62	D4-cystine	5	5000	ng/mL	0.000974	0.00364	[41]	0.57
63	DA-7010 (novel antibacterial candidate)	10	10000	ng/mL	1.5989	0.0002938	[42]	1.00
64	Decitabine	1	500	ng/mL	0.0053	0.0915	[34]	0.06
65	Dehydro Amlodipine	0.24	24.58	nM	0.11176	0.03085	[43]	0.47
66	Dehydro Amlodipine	0.24	24.58	nM	0.1528	0.3293	[43]	0.11
67	Dehydroepiandrosterone	4.6	250	ng/mL	0.02	0.00	[13]	1.00
68	Dexametasone	1.5	150	ng/mL	0.0044	0.0015	[44]	0.82

69	Dexamethasone, plasma	0.1	100	ng/mL	0.414	-0.0207	[16]	2.00
70	Dexamethasone, retina	0.1	100	ng/mL	0.474	-0.00997	[16]	1.27
71	Dexamethasone, vitreous	0.1	100	ng/mL	0.560	-0.0216	[16]	1.63
72	Diazepam	5	100	pg/ μ L	0.1539	-0.0716	[32]	1.10
73	Dimethyltryptamine	3	1109	pg/mL	281.50213	0.00231	[45]	1.00
74	Diosgenin	0.50	447.00	ng/mL	0.0002563	0.00142	[26]	0.08
75	Diquat	0.05	20	μ g/mL	316000.00	28200.00	[46]	0.36
76	Doxorubicin	0.017	8.6	μ M	0.0365	0.533	[47]	0.00
77	ELVYETVR-2	25	5000	mIU/mL	2316.50438	18612.30584	[29]	0.76
78	Erdafitinib	0.05	2.00	μ g/mL	0.9597	-0.0013	[48]	1.03
79	Eucalyptol	1	10000	ng/mL	0.0003	0.0022	[30]	0.12
80	Eugenol	1	1000	ng/mL	6.00E-05	-0.0009	[30]	-0.07
81	Ezetimibe	0.050	50.000	ng/patch	33540	537.1	[27]	0.76
82	Favipiravir	3	60.0	μ g/mL	0.00003381	0.004900433	[49]	0.07
83	Fenofibrate	0.003	50.000	ng/patch	444900	341000	[27]	0.00
84	Fentanyl	1	100	pg/ μ L	0.0944	-0.0418	[32]	1.79
85	Fludrocortisone	10	1000	pg/ml	0.00191951	0.222242	[50]	0.09
86	Flurbiprofen	5	5000	ng/mL	0.0000082061	-0.000017079	[51]	1.71
87	Fluvastatin	0.018	50.000	ng/patch	42820	131.3	[27]	0.85
88	Galgravin	1.0	500	ng/mL	0.020756	0.005814	[52]	0.78
89	Gemfibrozil	0.017	50.000	ng/patch	10650	344.5	[27]	0.34
90	Ginsenoside Rb1	5	10000	ng/mL	0.0001	0.0005	[27]	0.50
91	Ginsenoside Rc	5	10000	ng/mL	0.0002	0.0010	[27]	0.50
92	Ginsenoside Rd	5	10000	ng/mL	0.0005	0.0028	[27]	0.47
93	Ginsenoside Rg1	0.63	389	ng/mL	0.00002525	0.00009435	[26]	0.15
94	Ginsenoside Rh1	5	10000	ng/mL	0.0006	0.0015	[53]	0.67
95	Globotriaosylsphingosine	0.25	100	ng/mL	0.42302	0.14881	[54]	0.42
96	Glutamic acid	2.79	5720	ng/mL	21.7154	57.0464	[19]	0.52
97	Glutamine	4.96	5080	ng/mL	25.9211	4.1991	[19]	0.97
98	Glycine	16.25	4160	ng/mL	6.5835	17.8001	[19]	0.86
99	HER-2 protein	0.000001	1	nM	-45.233	36.633	[55]	0.00
100	Histamin	0.01	20	ng/mL	0.97	0.031	[56]	0.24
101	Histamin	0.1	32	pg/mL	1.11	-0.029	[56]	1.35
102	Histidine	4.25	4352	ng/mL	39.1237	302.7673	[19]	0.36
103	Hydrocortisone Phosphate	5	1000	ng/mL	0.043	0.054	[57]	0.80
104	Hydroxycotinine	6.00	336	ng/mL	0.01801	0.01541	[38]	0.88
105	Hydroxyproline	8.05	4120	ng/mL	33.6225	9.4106	[19]	0.97
106	Isoleucine	0.61	5000	ng/mL	71.1636	111.2613	[19]	0.28
107	Isoliquiritigenin	0.39	356.10	ng/mL	0.00220	-0.0002625	[26]	1.44
108	Letrozole	0.01	1	μ g/ ml	3583.7	734.63	[58]	0.06
109	Leucine	1.00	4080	ng/mL	81.4774	135.3090	[19]	0.38
110	Linezolid	3.0	25	mg/mL	0.0008	-0.0012	[59]	1.88
111	Lipoprotein lipase peptide 1	12.5	2500	pM	0.000928	0.0114	[60]	0.51
112	Lorazepam	5	100	pg/ μ L	0.0172	0.0285	[32]	0.76
113	Lovastatin	0.015	50.000	ng/patch	61880	2088	[27]	0.31

Incorrect determination of lower limit of quantification (LLOQ) of analytical methods

114	luteolin	0.2	50	ng/mL	0.00448	0.000939	[12]	0.49
115	Lysine	3.44	3521	ng/mL	32.6282	198.7964	[19]	0.36
116	Lysosomal acid lipase	25	2500	pM	0.00158	-0.0163	[60]	1.70
117	Malondialdehyde	0.2	20	µg/g	21.749	-8928.3	[61]	0.01
118	Melatonin	1	1000	pg/ml	0.00774	-0.00079	[62]	1.11
119	Methionine	1.11	4560	ng/mL	55.3991	-26.8628	[19]	1.78
120	Methotrexate	10	500	ng/mL	0.000224	0.000654	[17]	0.78
121	Methoxyfuranodiene	7.88	252.0	ng/mL	0.0363	-0.0127	[39]	1.05
122	Methylprednisolone	10	500	ng/mL	0.0296	0.4	[17]	0.44
123	Myrislignan	1	1000	ng/mL	0.00202	-0.00104	[63]	2.06
124	Neferine	0.31	279.00	ng/mL	0.00133	0.00776	[26]	0.05
125	Neoline	0.50	200.00	ng/mL	0.0202	0.0118	[15]	0.46
126	Nicotine	0.50	28.0	ng/mL	0.15171	0.03676	[38]	0.68
127	Nicotinic Acid	0.012	50.000	ng/patch	63740	116500	[27]	0.01
128	Nordiazepam	1	100	pg/µL	0.2284	-0.2942	[32]	-3.43
129	Nuciferine	0.41	367.50	ng/mL	0.02406	-0.00469	[26]	1.91
130	Omeprazole	1	500	ng/mL	0.00725	0.00028	[17]	0.96
131	Oxazepam	10	100	pg/µL	0.1000	-0.0004	[32]	1.00
132	Pachymic acid	0.38	355.50	ng/mL	0.000076916	0.00537	[26]	0.01
133	Palmatine	1	500	ng/mL	0.015	-0.021	[64]	-2.49
134	Panaxadiol	0.44	397.50	ng/mL	0.00102	0.00061385	[26]	0.42
135	Paraquat	0.05	20	µg/mL	376000.00	133.00	[46]	0.99
136	p-Coumaric Acid	0.2	20	ng/mL	6819.89	1013.91	[65]	0.58
137	p-Cresol	0.5	30	µg/mL	8.9645	1.89	[66]	0.71
138	Phenylalanine	1.21	4960	ng/mL	293.9884	260.6369	[19]	0.58
139	Picrocrocin	10.00	3200.00	ng/mL	0.002674921	0.00435742	[36]	0.86
140	Platycodin D	0.42	382.50	ng/mL	0.000035807	0.0000274	[26]	0.36
141	Pravastatin	0.046	50.000	ng/patch	47100	5685	[27]	0.28
142	Pregnenolone	6.4	250	ng/mL	0.002	0.02	[13]	0.41
143	Proline	2.05	4200	ng/mL	246.6109	2569.574	[19]	0.16
144	Propofol glucuronide	0.5	500	µg/mL	0.4545	3.1022	[67]	0.07
145	Propranolol	5	100	pg/µL	0.1148	-0.0418	[32]	1.07
146	Putative phospholipase B-like 2 peptide 7	6.25	2500	pM	0.0017	-0.0053	[60]	1.99
147	R-(+)-Verapamil	0.5	500	ng/mL	0.0025	0.0389	[68]	0.03
148	R-Dioxopromethazine	1.00	80.00	ng/mL	0.079	0.034	[69]	0.70
149	Remogliflozin etabonate	5	300	ng/mL	0.0144	0.0307	[70]	0.71
150	Renin	0.1	33	pg/ml	0.856	0.00129	[20]	0.99
151	Rosuvastatin	0.013	50.000	ng/patch	45620	739.8	[27]	0.45
152	S-(-)-Verapamil	0.5	500	ng/mL	0.0023	0.0434	[68]	0.03
153	Safranal	10.00	3200.00	ng/mL	0.007429112	0.02994744	[36]	0.71
154	Sarecycline	1	1000	ng/mL	0.00197147	-0.0015151	[71]	4.32
155	S-Dioxopromethazine	1.00	80.00	ng/mL	0.079	0.037	[69]	0.69
156	Serine	4.49	4600	ng/mL	36.0282	135.8935	[19]	0.54
157	Simvastatin	0.007	50.000	ng/patch	133500	41680	[27]	0.02
158	SKBR-3 cells	20	2000	cell/mL	-0.3575	1021	[72]	0.00

159	Songorine	0.20	80.00	ng/mL	0.0146	0.00709	[15]	0.29
160	Sophoridine	2	2000	ng/mL	0.009214	0.007572	[73]	0.71
161	Sulbactam	0.25	200	μg/mL	0.0588	0.0008	[22]	0.95
162	THC	0.2	100	ng/mL	0.0484	-0.0011	[14]	1.13
163	THC-COOH	0.2	100	ng/mL	0.0616	-0.0016	[14]	1.15
164	Theophylline	10	500	ng/mL	0.000211	0.000867	[17]	0.71
165	Threonine	2.46	5040	ng/mL	29.4302	140.763	[19]	0.34
166	Trans crocetin	10.00	3200.00	ng/mL	0.002001102	0.002474666	[36]	0.89
167	Trans-2-gg-crocin	10.00	3200.00	ng/mL	0.002490268	-0.000108653	[36]	1.00
168	Trans-3-Gg-crocin	10.00	3200.00	ng/mL	0.002373485	-0.000003492705	[36]	1.00
169	Trans-4-GG-crocin	10.00	3200.00	ng/mL	0.001106907	0.000787308	[36]	0.93
170	Trelagliptin	4	1000	nM	0.0036	0.0099	[74]	0.59
171	Trifluralin	0.00001	1	mM	4.09	0.35	[75]	0.00
172	Tryptophan	1.19	4880	ng/mL	168.0951	-8.2806	[19]	1.04
173	Tyrosine	1.31	5360	ng/mL	65.7911	47.0506	[19]	0.65
174	Upadacitinib	1.0	200	ng/mL	0.0754	0.1276	[76]	0.37
175	Valine	1.22	5000	ng/mL	410.7137	920.6263	[19]	0.35
176	Valproic Acid	0.075	15.0	μg/mL	0.32003	-0.02029	[35]	6.44
177	Vildagliptin	5	300	ng/mL	0.0118	-0.0014	[70]	1.02
178	VTVMGGFK-1	25	5000	mIU/mL	1351.99987	12817.41859	[29]	0.73
179	VTVMGGFK-3	25	5000	mIU/mL	458.53518	6670.91221	[29]	0.63
180	α-Pinene	3.97	127.0	ng/mL	0.0502	-0.011	[39]	1.06
181	α-Thujone	2	5000	ng/mL	0.0006	-0.0051	[30]	-0.31
182	β-Caryophyllene	2	10000	ng/mL	0.0003	0.0068	[30]	0.08
183	β-D-N4-hydroxycytidine	1	5000	pmol/sample	0.0153	-0.00124	[77]	1.09
184	β-D-N4-hydroxycytidine-triphosphate	1.00	1500	pmol/sample	0.0153	-0.00124	[77]	1.09
185	β-Elemene	21.38	684.0	ng/mL	0.2011	-0.1613	[39]	1.04

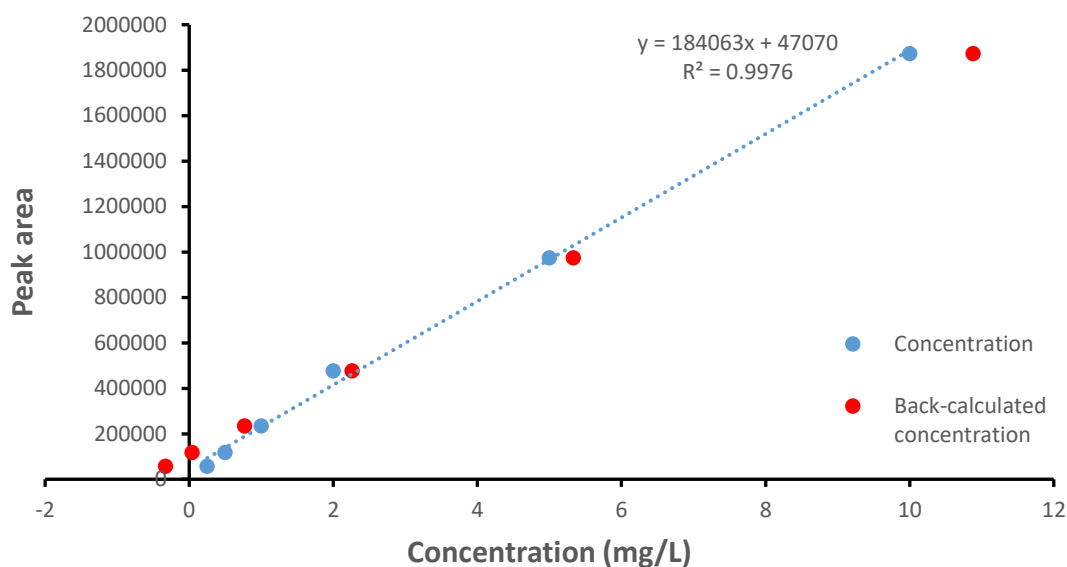


Figure 1. Peak area vs. concentration of an analytical method. Blue points are the concentrations of standard solution and red points are back-calculated concentrations. The R^2 value is higher than 0.99 while there is a significant difference between the concentrations of standard solution and back-calculated concentrations and the back-calculated LLOQ value is negative.

4. CONCLUSION

Developing an accurate method for quantification of an analyte is crucial. The most of decisions and guidelines in chemistry and medical sciences is performed based on the obtained concentration of an analyte. In medical sciences, decision about the efficacy of a therapeutic protocol is performed based on the concentration of drugs and biomarkers in biological samples. Therefore, this issue shows the importance of developing an accurate analytical method. LOD and LOQ which are the classic parameters for determination of the sensitivity of a method have some weaknesses discussed in previous works. LLOQ is recommended by FDA and, recently applied by researchers for evaluating the sensitivity of a method, thoroughly analyzed in this work. Some criteria were proposed for the determination of LLOQ and analysis of published articles indicates that the most of articles did not consider these parameters in reporting LLOQ. This issue confirms the importance of more attention by editors and journals in assessing manuscripts related to developing analytical methods.

ACKNOWLEDGMENTS

The research reported in this publication was supported by the Tabriz University of Medical Sciences (code: 74922).

CONFLICTS OF INTEREST

Authors have no conflict of interest.

REFERENCES

1. J. Uhrovčík. Strategy for determination of LOD and LOQ values - Some basic aspects. *Talanta*, **119**, 178–180 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.061>
2. S. Bansal & A. DeStefano. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J.*, **9**(1), 11 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1208/aapsj0901011>
3. M. Kaza, M. Karaźniewicz-Łada, K. Kosicka, A. Siemiątkowska & P.J. Rudzki. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **165**, 381–385 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.030>
4. S. Ershadi & A. Shayanfar. Are LOD and LOQ reliable parameters for sensitivity evaluation of spectroscopic methods? *J. AOAC Int.*, **101**(4), 1212–1213 (2018). Doi: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0363>
5. R. Kaviani. Comparison of different approaches for calculating LOD and LOQ in an HPLC-based analysis method. *Pharm Sci.*, **31**(1), 106–109 (2025). Doi: <https://doi.org/10.34172/ps.024.40452>
6. A. Shayanfar & S. Ershadi. Developing new criteria for validity evaluation of analytical methods. *J. AOAC Int.*, **102**(6), 1908–1916 (2019). doi: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0007>
7. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*, 2018. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
8. A. Shayanfar. Beware of bar charts for plotting calibration curves for analytical method development. *J. AOAC Int.*, **103**(5), 1424–1425 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa023>
9. A. Shayanfar. A critical issue in calibration curve with logarithmic scale. *ImmunoAnalysis*, **1**(1), 9 (2021). Doi: <https://doi.org/10.34172/ia.2021.09>
10. A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, M. Khoubnasabjafari, V. Jouyban-Gharamaleki & M.R. Afshar-Mogaddam. Derivatization and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction of salbutamol in exhaled breath condensate samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **191**, 113572 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113572>
11. X. Zhu. A linear validation method of analytical procedures based on the double logarithm function linear fitting. *Anal. Chim. Acta*, **1310**, 342695 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342695>
12. X. Chen, X. Wang, L. Ma, S. Fang, J. Li, E.O. Boadi, *et al.* The network pharmacology integrated with pharmacokinetics to clarify the pharmacological mechanism of absorbed components from *Vitex fructus* extract. *J. Ethnopharmacol.*, **278**, 114336 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114336>
13. D.O. Qasrawi, J.M. Boyd, S.M.H. Sadrzadeh. Measuring steroids from dried blood spots using tandem mass spectrometry to diagnose congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Chim. Acta*, **520**, 202–207 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.06.005>
14. M.K. Mohamed, J. Takyi-Williams, B. Baudot & A. Grobler. Development and validation of a LC-HRMS method for the quantification of cannabinoids and their metabolites in human plasma. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **159**, 105705 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105705>
15. X. Wang, H. Lei, X. Qi, X. Guo, X. Xu, X. Zu, *et al.* Simultaneous determination of five bioactive components of XiaoJin Capsule in normal and mammary gland hyperplasia rat plasma using LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, **35**(3), e5000 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.5000>
16. J. Gu, J. Wang, A. Krishna, L. Xu, S. Stewart, Y. Wang, *et al.* Simultaneous quantification of dexamethasone and 6 β -hydroxydexamethasone in rabbit plasma, aqueous and vitreous humor, and retina by UHPLC-MS/MS. *Bioanalysis*, **13**(13), 1051–1062 (2021). Doi: <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0088>

17. A. Husain, M. Riyazuddin, R. Katekar, S. Verma, A.A. Syed, P. Singh, *et al.* Herb–drug interaction studies of ethanolic extract of *Cassia occidentalis* L. coadministered with acetaminophen, theophylline, omeprazole, methotrexate and methylprednisolone. *Phytomed. Plus*, **1**(1), 100008 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2020.100008>
18. R.L. Jayaraj, H. Narchi, R. Subramanian & P. Yuvaraju. Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of ATP, ADP and AMP in dried blood spot, liver and brain of neonate mice pups. *Results Chem.*, **3**, 100172 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100172>
19. B. Yuan, W. Lyu, F.F. Dinssa, J.E. Simon & Q. Wu. Free amino acids in African indigenous vegetables: Analysis with improved hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and interactive machine learning. *J. Chromatogr. A*, **1637**, 461733 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461733>
20. F. Chen, Z. Cheng, Y. Peng, Z. Wang, C. Huang, D. Liu, *et al.* A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based assay for simultaneous quantification of aldosterone, renin activity, and angiotensin II in human plasma. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1179**, 122740 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122740>
21. S. Huang, Y. Zhang, Y. Zhang, J. Liu, Z. Liu & X. Wang. Establishment of LC-MS/MS method for determination of alopurinol in rat plasma and its application in pre-clinical pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1173**, 122671 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122671>
22. D. Nalbant, J.A. Reeder, P. Li, C.T. O'Sullivan, W.K. Rogers & G. An. Development and validation of a simple and sensitive LC-MS/MS method for quantification of ampicillin and sulbactam in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **196**, 113899 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113899>
23. W. Guo, Z. Shi, J. Zhang, T. Zeng, Y. He & Z. Cai. Analysis of aristolochic acid I in mouse serum and tissues by using magnetic solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS. *Talanta*, **235**, 122774 (2021). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122774>
24. A.D. Rogachev, V.P. Putilova, A.V. Zaykovskaya, O.I. Yarovaya, A.S. Sokolova, V.V. Fomenko, *et al.* Biostability study, quantitation method and preliminary pharmacokinetics of a new antilipovirus agent based on borneol and 3-(piperidin-1-yl)propanoic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **199**, 114062 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114062>
25. S.S. Al-nimry & M.S. Khanfar. Validation of an RP-HPLC method for the determination of asenapine maleate in dissolution media and application to study *in vitro* release from co-crystals. *Sci. Pharm.*, **89**(1), 14 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/scipharm89010014>
26. X. Xu, W. Wang, Y. Chen, Q. Zhang, B. Li, Y. Zhong, *et al.* Simultaneous determination of ten bioactive components from Shenling Baizhu San in rat plasma by UHPLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and two models of ulcerative colitis rats. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, **2021**, 518241 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/3518241>
27. Q. Du, Y. Zhang, J. Wang & B. Liu. Simultaneous determination and quantitation of hypolipidemic drugs in fingerprints by UPLC-Q-TRAP/MS. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1175**, 122496 (2021). doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122496>
28. X. Xu, S. Luo, Q. Yang, Y. Wang, W. Li, G. Lin, *et al.* Development and validation of the quantitative determination of avapritinib in rat plasma by a bioanalytical method of UPLC-MS/MS. *Arab. J. Chem.*, **14**(6), 103152 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103152>
29. F. Rashid, R. Baghla, P. Kale, M. Shah, D. Malakar & M. Pillai. Absolute quantification of follicle stimulating hormone (FSH) using its signature peptides and enzymatic digestion in human serum by UPLC/LC–MS/MS. *Chromatographia*, **84**(8), 793–802 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10337-021-04057-4>
30. M.Z. Hou, L.L. Chen, C. Chang, J.F. Zan & S.M. Du. Pharmacokinetic and tissue distribution study of eight volatile constituents in rats orally administrated with the essential oil of *Artemisiae argyi* folium by GC–MS/MS. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1181**, 122904 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122904>

31. A. Demurtas, S. Pescina, S. Nicoli, P. Santi, D. Ribeiro de Araujo & C. Padula. Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1164**, 122512 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122512>
32. M. Thirukumaran, V. Singh, Y. Arao, Y. Fujito, M. Nishimura, T. Ogura, *et al.* Solid-phase microextraction- probe electrospray ionization devices for screening and quantitating drugs of abuse in small amounts of biofluids. *Talanta*, **231**, 122317 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122317>
33. M. Lu, X. Lu, Z. Yu & C. Wen. Determination and pharmacokinetics of calycanthine in rat plasma by UPLC-MS/MS. *Acta Chromatogr.*, **33**(1), 91-95 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1556/1326.2020.00772>
34. P.N. Sai, B.S. Venkateswarlu, M.V. Kumudhavalli & V. Muruganantham. Bio-analytical method development and validation for the simultaneous estimation of decitabine and cedazuridine in human plasma using LC-MS/MS. *Int. J. Appl. Pharm.*, **13**(5), 257-262 (2021). Doi: <https://doi.org/10.22159/ijap.2021v13i5.41744>
35. K. Lipska, A. Gumieniczek, R. Pietraś & A.A. Filip HPLC-UV and GC-MS methods for determination of chlorambucil and valproic acid in plasma for further exploring a new combined therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Molecules*, **26**(10), 2903 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26102903>
36. A. Girme, S. Pawar, C. Ghule, S. Shengule, G. Saste, A.K. Balasubramaniam, *et al.* Bioanalytical method development and validation study of neuroprotective extract of Kashmiri saffron using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS): *In vivo* pharmacokinetics of apocarotenoids and carotenoids. *Molecules*, **26**(6), 1815 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26061815>
37. E. Aydin, B. Drotleff, H. Noack, B. Derntl & M. Lämmerhofer. Fast accurate quantification of salivary cortisol and cortisone in a large-scale clinical stress study by micro-UHPLC-ESI-MS/MS using a surrogate calibrant approach. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1182**, 122939 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122939>
38. N. Mallock, A. Rabenstein, P. Laux, T. Rüther, C. Hutzler, M.K. Parr, *et al.* Rapid, sensitive, and reliable quantitation of nicotine and its main metabolites cotinine and trans-3'-hydroxycotinine by LC-MS/MS: Method development and validation for human plasma. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1179**, 122736 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122736>
39. A.S. Alqahtani, R.N. Herqash, F. Alqahtani, S.R. Ahamad, F.A. Nasr & O.M. Noman. GC-MS method for quantification and pharmacokinetic study of four volatile compounds in rat plasma after oral administration of *Commiphora myrrh* (Nees) Engl. resin and *in vitro* cytotoxic evaluation. *Separations*, **8**(12), 239 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/separations8120239>
40. A. Yamaguchi & H. Miyaguchi. A screening method for cyanide in blood by dimethoxytriazinyl derivatization-GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **59**(1), 1-6 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa081>
41. S. Li, Z. Lu, L. Jiao, R. Zhang, Y. Hong, T. Aa, *et al.* Quantitative determination of D4-cystine in mice using LC-MS/MS and its application to the assessment of pharmacokinetics and bioavailability. *J Pharm. Anal.*, **11**(5), 580-587 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.08.010>
42. M.H. Kwon, D.Y. Lee & H.E. Kang. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of the novel antibacterial candidate DA-7010 in plasma and application to a preclinical pharmacokinetic study. *Pharmaceuticals*, **14**(2), 163 (2021). doi: <https://doi.org/10.3390/ph14020163>
43. Z.J. Zhong, Z.P. Yao, Z.Q. Shi, Y.D. Liu, L.F. Liu & G.Z. Xin. Measurement of intracellular nitric oxide with a quantitative mass spectrometry probe approach. *Anal. Chem.*, **93**(24), 8536-8543 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01259>
44. T. Meng, L. Kosmider, G. Chai, A.A. Moothedathu-Raynold, A.C. Percy, B. Qin, *et al.* LC-MS/MS method for simultaneous quantification of dexamethasone and tobramycin in rabbit ocular biofluids. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1170**, 122610 (2021). doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122610>

45. M. Liu, H. Yang, J. Hu, B. Shen, P. Xiang, H. Qiang, *et al.* Analysis of 28 hair samples from users of the hallucinogenic beverage ayahuasca. *Forensic Sci. Int.*, **323**, 110790 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110790>
46. G. Yuan, R. Li, Q. Zhao, X. Kong, Y. Wang, X. Wang, *et al.* Simultaneous determination of paraquat and diquat in human plasma by HPLC-DAD: Its application in acute poisoning patients induced by these two herbicides. *J. Clin. Lab. Anal.*, **35**(3), e23669 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.23669>
47. M. Ehsani, J. Soleymani, M. Hasanzadeh, Y. Vaez-Gharamaleki, M. Khoubnasabjafari & A. Jouyban. Sensitive monitoring of doxorubicin in plasma of patients, MDA-MB-231 and 4T1 cell lysates using electroanalysis method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **192**, 113701 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113701>
48. T. Elawady, A. Khedr, N. El-Enany & F. Belal. HPLC-UV determination of erdafitinib in mouse plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1171**, 122629 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122629>
49. M. Hailat, I. Al-Ani, M. Hamad, Z. Zakareia & W. Abu Dayyih. Development and validation of a method for quantification of favipiravir as covid-19 management in spiked human plasma. *Molecules*, **26**(13), 3789 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26133789>
50. N.V. Baymeeva, A.I. Platova, I.I. Miroshnichenko, A.Y. Belovolov, V.D. Gladkikh & A.M. Tatarinov. High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry method for quantitative determination of fludrocortisone in human blood plasma. *Pharm. Chem. J.*, **55**(5), 510–415 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11094-021-02453-6>
51. M.E. Yaman, A. Atila, T.C. Akman, M. Albayrak, Y. Kadioglu & Z. Halici. A sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of flurbiprofen in rat plasma: Application to real sample. *J. Chromatogr. Sci.*, **59**(6), 502–509 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab047>
52. L. Zhao, S. Wang, X. Huang, Y. Fan, Z. Xue, D. Yang, *et al.* Pharmacokinetic and bioavailability studies of galgravin after oral and intravenous administration to rats using HPLC-MS/MS method. *BioMed Res. Int.*, **2021**, 919789 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9919789>
53. L.Y. Du, T. Jiang, K. Wei, S. Zhu, Y.L. Shen, P. Ye, *et al.* Simultaneous quantification of four ginsenosides in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and depression rats using UHPLC-MS/MS. *J. Anal. Methods Chem.*, **2021**, 488822 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/4488822>
54. K. Tanaka, H. Sugiyama, H. Morinaga, A. Onishi, K. Tanabe, H.A. Uchida, *et al.* Late-onset renal variant Fabry disease with R112H mutation and mild increase in plasma globotriaosylsphingosine: a case report. *Front. Med.*, **11**, 1383308 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1383309>
55. H. Nasrollahpour, I. Isildak, M.R. Rashidi, E.A. Hashemi, A. Naseri & B. Khalilzadeh. Ultrasensitive bioassaying of HER-2 protein for diagnosis of breast cancer using reduced graphene oxide/chitosan as nanobiocompatible platform. *Cancer Nanotechnol.*, **12**(1), 10 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00082-y>
56. X. Hu, X. Bian, W.Y. Gu, B. Sun, X. Gao, J.L. Wu, *et al.* Stand out from matrix: Ultra-sensitive LC-MS/MS method for determination of histamine in complex biological samples using derivatization and solid phase extraction. *Talanta*, **225**, 122056 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122056>
57. N. Tanna, L.G. Mullin, P.D. Rainville, I.D. Wilson & R.S. Plumb. Improving LC/MS/MS-based bio-analytical method performance and sensitivity via a hybrid surface barrier to mitigate analyte – metal surface interactions. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1179**, 122825 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122825>
58. M. Shaban, S. Ghaffary, J. Hanaee, A. Karbakhshzadeh & S. Soltani. Synthesis and characterization of new surface modified magnetic nanoparticles and application for the extraction of letrozole from human plasma and analysis with HPLC-fluorescence. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **193**, 113659 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113659>
59. H.Y. Kim, E. Ruiter, E.M. Jongedijk, H.K. Ak, B.J. Marais, B. Pk, *et al.* Saliva-based linezolid monitoring on a mobile UV spectrophotometer. *J. Antimicrob. Chemother.*, **76**(7), 1786–1792 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkab075>

60. Y. Chen, C.F. Xu, B. Stanley, G. Evangelist, A. Brinkmann, S. Liu, *et al.* A highly sensitive LC-MS/MS method for targeted quantitation of lipase host cell proteins in biotherapeutics. *J. Pharm. Sci.*, **110**(12), 3811–3818 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.08.024>
61. G. Jitcă, E. Fogarasi, B.E. Ősz, C.E. Vari, A. Tero-Vescan, A. Miklos, *et al.* A simple HPLC/DAD method validation for the quantification of malondialdehyde in rodent's brain. *Molecules*, **26**(16), 5066 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26165066>
62. W. Jin, J. Gui, G. Li, F. Jiang & D. Han. High-throughput quantitation of trace level melatonin in human milk by on-line enrichment liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **1176**, 338764 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338764>
63. J. Zhang, H. Si, J. Sun, K. Lv, B. Yan, B. Li, *et al.* Determination of myrislignan levels in BALB/c mouse plasma by LC-MS/MS and a comparison of its pharmacokinetics after oral and intraperitoneal administration. *BMC Vet. Res.*, **17**(1), 275 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02990-y>
64. J. Li, Y. Hu, Y. Wu, T. Feng, C. Wen & X. Jiang. Pharmacokinetics of palmatine in rat after oral and intravenous administration by UPLC-MS/MS. *Acta Chromatogr.*, **33**(1), 25–29 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1556/1326.2020.00712>
65. H. Kim, Y. Choi, Y. An, Y.R. Jung, J.Y. Lee, H.J. Lee, *et al.* Development of p-coumaric acid analysis in human plasma and its clinical application to PK/PD study. *J. Clin. Med.*, **10**(1), 108 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm10010108>
66. M. Moradi, J. Soleymani, H. Tayebi-Khosroshahi, M. Khoubnasabjafari & A. Jouyban. Simple determination of p-cresol in plasma samples using fluorescence spectroscopy technique. *Iran. J. Pharm. Res.*, **20**(2), 68–78 (2021). Doi: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.114330.14799>
67. J. Pyo. Rapid evaluation method for propofol abusing with hair by using centrifugal filter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Curr. Pharm. Anal.*, **17**(9), 1171–1177 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2174/1573412916999200801023457>
68. M. Hefnawy, A. Al-Majed, H. Alrabiah, N. Algrain, M. Mohammed & Y.B. Jordan. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for the enantioanalysis of verapamil in rat plasma using superficially porous silica isopropyl-cyclofructan 6 chiral stationary phase after SPE: Application to a stereoselective pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **201**, 114108 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114108>
69. J. Lun, W. Zhang, Y. Zhao, Y. Song & X. Guo. Enantiomeric separation of dioxopromethazine and its stereoselective pharmacokinetics in rats by HPLC-MS/MS. *J. Pharm. Sci.*, **110**(8), 3082–3090 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.015>
70. S.N. Prudhvi, B.S. Venkateswarlu, M.V. Kumudhavalli & V. Muruganantham. Novel stability indicating LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of Remogliflozin etabonate and Vildagliptin human plasma. *J. Med. Pharm. Allied Sci.*, **10**(5), 3718–3725 (2021). Doi: <https://doi.org/10.22270/jmpas.v10i5.1655>
71. Y. Shen, D. Meng, F. Chen, H. Jiang, L. Hu, Y. Zhou, *et al.* Determination of sarecycline by UPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study in rats. *Acta Chromatogr.*, **33**(3), 228–233 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1556/1326.2020.00796>
72. H. Nasrollahpour, M. Mahdipour, I. Isildak, M.R. Rashidi, A. Naseri & B. Khalilzadeh. A highly sensitive electrochemiluminescence cytosensor for detection of SKBR-3 cells as metastatic breast cancer cell line: A constructive phase in early and precise diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, **178**, 113023 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113023>
73. M. Chen, Q. Jiang, M. Zhang, S. Chen, J. Lou, Y. Chen, *et al.* Establishment of quantitative methodology for sophoridine analysis and determination of its pharmacokinetics and bioavailability in rat. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **47**(5), 741–747 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1934862>
74. S. Mowaka, N. Ashoush, M.M. Tadros & B.M. Ayoub. Investigation of pharmacokinetic parameters of trelagliptin in Egyptian volunteers using sensitive LC-MS/MS: A comparative study with a Japanese population. *J. Anal. Methods Chem.*, **2021**, 9664099 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9664099>
75. M. Mahmoudpour, A. Saadati, M. Hasanzadeh & H. Kholafazad-kordasht. A stretchable glove sensor toward rapid monitoring of trifluralin: A new platform for the on-site recognition of herbicides

- based on wearable flexible sensor technology using lab-on-glove. *J. Mol. Recogn.*, **34**(10), 2923 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1002/jmr.2923>
76. M.J. Wang, Y.H. Zhao, C. Fan, Y.J. Wang, X.Q. Wang, X.J. Qiu, *et al.* Development of an UPLC-MS/MS method for the quantitative analysis of upadacitinib in beagle dog plasma and pharmacokinetics study. *Drug Des. Dev. Ther.*, **15**, 4167–4175 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2147/dddt.s332282>
77. T.L. Parsons, L.A. Kryszak & M.A. Marzinke. Development and validation of assays for the quantification of β -D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β -D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1182**, 122921 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122921>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

A. Shayanfar & S. Rastgoo. Incorrect determination of lower limit of quantification (LLOQ) of analytical methods. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 145–159 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117696>

Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

Rosalía González-Fernández¹, Yamilé Heredia-Díaz², Julio César Escalona-Arraz³,
Yuselis Ramos-Domínguez⁴, Paul Cos⁵ & Jesús García-Díaz^{6,*}

¹ Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Universidad de Ciencias Médicas, Autopista Nacional Km 11/2 s/n, Santiago de Cuba 90400, Cuba; Correo-e: rosaliagonzalez.9110@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8268-2428>

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Avenida Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500, Cuba; Correo-e: yherediad@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3863-0668>

³ Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Angamos, Antofagasta 0610, Chile; Correo-e: julio.escalona@ucn.cl, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3609-4451>

⁴ Farmacia, Hospital General Docente Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso, Carretera del Caney Km 2 1/2, Santiago de Cuba 90100, Cuba; Correo-e: yusidominguez@gmail.com

⁵ Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Universidad de Amberes, Universiteitsplein 1, 2610, Amberes, Bélgica. Correo-e: paul.cos@uantwerpen.be, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4361-8911>

⁶ Departamento de Farmacognosia y Botánica Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Charles, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, República Checa. Correo-e: jgadi1990@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2309-3417>

*Autor para correspondencia: jgadi1990@gmail.com

Recibido: 1 de julio de 2024

Corregido: 21 de enero de 2025

Aceptado: 28 de enero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115477>

RESUMEN

Introducción: El *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., es una especie medicinal usada por la población cubana, que cuenta con pocos estudios científicos. **Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y parásitos de las hojas de *Z. fagara*. **Metodología:** Al material vegetal recolectado se le determinaron los parámetros farmacognósticos según lo establecido en la norma de la OMS para materiales vegetales. La actividad antimicrobiana *in vitro* a través de métodos colorimétricos de microdilución se le determinó a un extracto hidroalcohólico obtenido por percolación. Al extracto se le determinaron los parámetros físico-químicos, la composición química cualitativa, así como su contenido de fenoles y flavonoides totales a través del método de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. **Resultados:** Los parámetros farmacognósticos obtenidos fueron: humedad residual (11,5 %), cenizas totales (7,91 %), cenizas solubles en agua (2,64 %) y sustancia extraíble (agua, EtOH 30 %, 70 % y 95 %). Se identificaron los metabolitos siguientes: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos. El extracto hidroalcohólico 70% tuvo un olor característico, un color amarillo verdoso, densidad relativa de $0,9244 \pm 0,0651$; pH de 5,97, índice de refracción de 1,3605 y sólidos totales de 21,4 mg/100 mL. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 14,73 µg

de ácido gálico/mg y 3,11 µg de quercetina/mg respectivamente. El extracto no fue activo frente a bacterias y hongos, sin embargo, exhibió una potente actividad frente a los parásitos, siendo *Trypanosoma brucei* (CI₅₀ = 2,48 ± 1,38 µg/mL) el más sensible. **Conclusión:** Los resultados evidencian las potencialidades antiparasitarias de las hojas de *Z. fagara*.

Palabras claves: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., parámetros farmacognósticos, fenoles totales, flavonoides totales, actividad antimicrobiana *in vitro*

SUMMARY

Pharmacognostic study and *in vitro* antimicrobial activity of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg leaves

Introduction: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. is a medicinal species used by the Cuban population, which has scarce scientific reports. **Objective:** To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against bacteria, fungi and parasites of *Z. fagara* leaves. **Methodology:** Pharmacognostic parameters were determined as established in the WHO standard for plant materials. The *in vitro* antimicrobial activity for colorimetric microdilution methods was determined to a hydroalcoholic extract obtained by percolation. The physical-chemical parameters, qualitative chemical composition, as well as its content of phenols and total flavonoids were determined for the extract by the Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride respectively. **Results:** The pharmacognostic parameters obtained were: residual moisture (11.5 %), total ashes (7.91%), water-soluble ashes (2.64 %) and extractable substance (water, EtOH 30 %, 50 %, 70 % and 95 %). The following metabolites were identified: alkaloids, triterpenes and steroids, essential oils, flavonoids, carbohydrates, phenols and tannins. The 70% hydroalcoholic extract had a characteristic odor, a greenish-yellow color, relative density of 0.9244 ± 0.0651; pH of 5.97; refractive index of 1.3605 and total solids of 21.4 mg/100 mL. The content of total phenols and flavonoids was 14.73 µg of gallic acid/mg and 3.11 µg of quercetin/mg respectively. The extract was not active against bacteria and fungi, however, it exhibited potent activity against parasites, with *Trypanosoma brucei* (IC₅₀ = 2.48 ± 1,38 µg/mL) being the most sensitive. **Conclusion:** The results show the antiparasitic potential of *Z. fagara* leaves.

Keywords: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., pharmacognostic parameters, total phenolics, total flavonoids, *in vitro* antimicrobial activity.

RESUMO

Estudo farmacognóstico e atividade antimicrobiana *in vitro* de folhas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg

Introdução: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. é uma espécie medicinal utilizada pela população cubana, que possui escassos relatos científicos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias, fungos e parasitas das folhas de *Z. fagara*. **Metodologia:** Os parâmetros farmacognósticos foram determinados conforme estabelecido no padrão da OMS para materiais vegetais. A atividade antimicrobiana *in vitro* por métodos de microdiluição colorimétrica foi determinada para um extrato hidroalcoólico obtido por percolação. Os parâmetros físico-químicos, a composição química qualitativa, bem como o teor de fenóis e flavonóides totais foram determinados para o extrato pelo método de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio respectivamente. **Resultados:** Os parâmetros farmacognósticos obtidos foram: umidade residual (11,5 %), cinzas totais (7,91 %), cinzas solúveis em água (2,64 %) e substância extraível (água, EtOH 30 %, 50 %, 70 % e 95 %). Foram identificados os seguintes metabólitos: alcalóides, triterpenos e esteróides, óleos essenciais, flavonóides, carboidratos, fenóis e taninos. O extrato hidroalcoólico 70% apresentou odor característico, coloração amarelo-esverdeada, densidade relativa de 0,9244 ± 0,0651; pH de 5,97; índice de refração de 1,3605 e sólidos totais de 21,4 mg/100 mL. O

conteúdo de fenóis e flavonóides totais foi de 14,73 µg de ácido gálico/mg e 3,11 µg de quercetina/mg respectivamente. O extrato não foi ativo contra bactérias e fungos, porém apresentou potente atividade contra parasitas, sendo *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} = 2,48 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) o mais sensível. **Conclusão:** Os resultados mostram o potencial antiparasitário das folhas de *Z. fagara*.

Palavras-chave: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., parâmetros farmacognósticos, fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antimicrobiana *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de las plantas con fines medicinales se remonta desde épocas antiguas. Donde el hombre a través del tiempo ha buscado en ellas la cura para disímiles dolencias. Hoy en día, las investigaciones relacionadas con las especies vegetales se basan en fundamentar científicamente el uso etnomedicinal de estas [1]. Por lo que son cada vez más numerosas, a tal punto que en los últimos años el número de publicaciones ha ido en constante crecimiento ya que son consideradas fuentes naturales para la obtención de novedosas moléculas bioactivas [2, 3].

La medicina tradicional ha proporcionado soluciones terapéuticas para el control de agentes infecciosos [4]. Entre las enfermedades infecciosas se encuentran las bacterianas, fúngicas y parasitarias. A pesar de que existen tratamientos para estas afecciones, actualmente muchos microorganismos han creado resistencia a los antibióticos convencionales, a través de mutaciones genéticas y otros mecanismos, lo que constituye un problema de salud mundial actual [5]. Por lo que resulta de gran importancia estudiar extractos o sustancias puras aisladas de plantas medicinales, los cuales podrían contribuir a mejorar la terapéutica antimicrobiana.

A nivel mundial el género *Zanthoxylum* perteneciente a la familia Rutaceae, tiene un gran valor a nivel etnobotánico, de actividad biológica y fitoquímico [6-8]. Se reporta que diversas especies han sido utilizadas en distintas partes del mundo para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos. Como por ejemplo en la tos, enteritis, diarrea, resfriados, reumatismo, úlceras, enfermedades de los sistemas circulatorio y respiratorio, malaria, diabetes, hipertensión, infecciones causadas por diversos agentes patógenos, entre otras [8]. Numerosos estudios de extractos y metabolitos secundarios aislados han mostrado interesante actividad anticancerígena, insecticida, antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria [9]. Estas propiedades farmacológicas ha sido asociada a la presencia de diversos compuestos tales como: alcaloides, cumarinas, terpenoides y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos) [10].

En Cuba, este género se encuentra representado por 25 especies dentro de las que se encuentra la especie *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg [11]. El cual se conoce popularmente como: amoroso, aruña gato, limoncillo, tomeguín, zarza de tomeguín y tarro de chivo. Es un arbusto muy común en todas las costas secas y pedregosas de la Isla. La hoja como la corteza se han utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antipiréticas y sedantes. Además, se informa su uso por sus propiedades sudorífica, estimulante circulatorio y nervioso. Otros reportes en la isla, evidencia su empleo para tratar el reumatismo crónico y la sífilis [12, 13].

Se han reportado algunos estudios fitoquímicos de esta planta medicinal, en los cuales se ha demostrado la presencia de alcaloides [14], lignanos, cumarinas [15], saponinas, aceites esenciales [16], lactonas, azúcares reductores, fenoles y taninos [17]. Estos compuestos pudieran estar relacionados con las propiedades farmacológicas que han mostrado diferentes extractos, como son: antifúngica y antibacteriana [16-18]. No obstante, aún resultan limitados estos hallazgos que no permiten establecer el potencial real antimicrobiano de la especie, así como, el rol de la composición química de las hojas sobre esta actividad farmacológica. Esto

constituye un campo de interés por explorar de ahí que, se propone como objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y parásitos de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., lo que contribuirá a enriquecer su información científica y al desarrollo futuro de preparados medicinales naturales para el tratamiento de infecciones resistentes a las terapias actuales.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., se recolectaron en la mañana, en el Palenque (poblado de Siboney; 19°58'01.1"N 75°42'49.3"W), Santiago de Cuba. Una muestra de la planta herborizada fue sometida a identificación taxonómica en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO). La misma fue depositada en el Herbario "Jorge Sierra" de dicha institución con un número de ficha 19270. El material vegetal colectado, se secó a la sombra por 10 días y fue molinada en un molino de cuchilla marca MRC Modelo KM700 (Suiza).

2.2. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas

Se determinaron parámetros farmacognósticos tales como humedad residual, cenizas totales y cenizas solubles en agua y sustancias solubles, según lo descrito en la norma *Quality control methods for herbal materials* de la organización mundial de la Salud (OMS) [19]. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar.

2.2.1. Determinación de la humedad residual

La humedad residual se le determinó a través del método azeotrópico [19] y la **ecuación 1** se utilizó para el cálculo de este índice:

$$H = \frac{V_2 - V_1}{M} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde, V_1 : volumen de agua inicial, V_2 : volumen final de agua (mL), M : masa de la muestra (g), y 100: factor matemático para los cálculos.

2.2.2. Determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua

Para la determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua [19], se empleó una mufla (Yudian/China) y las pesadas fueron realizadas en una balanza analítica (Sartorius/Alemania). Cada determinación se realizó a partir de 2 g de la muestra. Los cálculos se efectuaron por ecuaciones 2, 3, 4 y 5:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$C_t = \frac{C_1 \times 100}{100 - H} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde, C_1 : Cenizas totales en base hidratada, C_t : Cenizas totales, M : Masa del crisol vacío (g), M_1 : Masa del crisol con la muestra de ensayo (g), M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g), 100: Factor matemático para los cálculos, y H : % humedad

Las cenizas solubles en agua (CSA) se determinaron a partir de las cenizas totales, luego de disolver las mismas en agua destilada.

$$C_1 = \frac{M_2 - M_4}{M_1 - M} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$CSA = \frac{C_1 \times 100}{100 - H} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde, C_1 : % cenizas solubles en agua en base hidratada, CSA: cenizas solubles en agua, M : masa del crisol vacío (g), M_1 : masa del crisol con la muestra de ensayo (g), M_2 : masa del crisol con las cenizas totales (g), M_4 : masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g), 100: Factor matemático para los cálculos, y H : % de humedad.

2.2.3. Determinación de sustancias solubles

El ensayo de sustancias solubles [19] se llevó a cabo a partir de 5 g de la droga vegetal seca pulverizada. Los solventes utilizados fueron agua, etanol al 30%, 70% y 95%. Los cálculos fueron realizados empleando la ecuación 6:

$$S_s = \frac{(R \times 500 \times 100)}{(M \times (100 - H))} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde, H : humedad de la muestra en %, 500 y 100: factores matemáticos para los cálculos, R : residuo de la muestra (g), y M : masa de la muestra (g).

2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

2.3.1. Obtención del extracto

El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el proceso de extracción de percolación con etanol al 70 % acorde al procedimiento descrito por Díaz y colaboradores [20].

2.3.2. Determinación los parámetros físico-químicos y químicos del extracto total

Al extracto obtenido se le determinaron los parámetros físico-químicos, la composición química cualitativa y cuantitativa. Los índices numéricos son expresados como la media ($n=3$) $\pm$ desviación estándar.

2.3.2.1. *Determinación de las características organolépticas*: al extracto total se le determinó el olor y el color.

2.3.2.2. *Determinación de pH*: se determinó en un pH-metro digital (Everich, China) con un electrodo combinado de vidrio y calomel con control de temperatura (T 25 °C).

2.3.2.3. *Determinación del índice de refracción*: se determinó con el prisma de medición de un refractómetro ABB (Carlseiss Jena, Alemania) previa calibración con agua destilada a la temperatura de 25 °C.

2.3.2.4. *Determinación de la densidad relativa*: se determinó por el método de picnometría. La densidad relativa (D) se calculó mediante la ecuación matemática siguiente:

$$D = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde, m : masa del picnómetro vacío (g), m_1 : masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g), y m_2 : masa del picnómetro con agua (g).

2.3.2.5. *Determinación de sólidos totales*: Los sólidos totales S_t se determinó por el método gravimétrico y utilizó la ecuación 8 para el cálculo:

$$S_t = \frac{P_r - P}{V} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde, P_r : masa de la cápsula más el residuo (g), P : masa de la cápsula vacía (g), V : volumen de la porción de ensayo (5 mL), y 100: factor matemático.

2.3.2.6. *Determinación de la composición química cualitativa*: Al extracto se le determinó la composición química cualitativa (alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, saponinas, resinas, mucílagos, aceites esenciales, azúcares reductores, fenoles y taninos, aminoácidos y aminas libres, carbohidratos, flavonoides, principios amargos y/o astringentes) según lo descrito por Rivas y colaboradores [21].

2.3.2.7. *Determinación de la composición química cuantitativa*: Al extracto se le determinó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE.UU) [22] y por el método colorimétrico con cloruro de aluminio (Sigma-Aldrich, EE.UU) [23] respectivamente (ver material suplementario). La medición espectrofotométrica fue realizada por triplicado en un Espectrofotómetro UV/VIS de la firma PG Instruments modelo T60 a una absorbancia de 760 nm (fenoles totales) y 420 nm (flavonoides totales). Se cuantificó la cantidad de compuestos fenólicos solubles totales y flavonoides totales presentes en el extracto, mediante la construcción de una curva patrón usando como estándar ácido gálico (Sigma-Aldrich, EE.UU) y quercetina (Sigma-Aldrich, EE.UU). Los resultados se expresaron como μg equivalente de ácido gálico/mg del extracto y μg en equivalente de quercetina/mg de extracto. Las ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales, expresadas como ácido gálico y quercetina, respectivamente, fueron:

$$\text{Conc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = \frac{AGE \times D}{P} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde: AGE: ácido gálico equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$), D : factor de dilución, y P : peso de la muestra (mg)

$$\text{Conc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = \frac{QE \times D}{P} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde: QE: quercetina equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$), D : factor de dilución, y P : peso de la muestra (mg).

2.3.3. *Ensayo de la actividad antimicrobiana in vitro*

Al extracto se le determinó la actividad antimicrobiana mediante un ensayo *in vitro* integral contra un panel de microorganismos integrado por bacterias, hongos y parásitos. Se emplearon métodos de microdilución colorimétricos y de conteo directo de tinción con solución de Giemsa al 10 %. Los ensayos fueron realizados según lo descrito por Diaz y colaboradores

(ver material suplementario) [24]. El extracto se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO, BDH, Poole, Inglaterra) 100% a una concentración madre de 20 mg/mL. A partir de esta disolución las muestras fueron diluidas sucesivamente 1:2 en agua desmineralizada hasta obtener 6 niveles de concentración: 128-4 µg/mL. Se emplearon como fármacos de referencia: doxiciclina (*S. aureus* y *E. coli*), flucitosina (*C. albicans*), miltefosina (*L. infantum*), benznidazol (*T. cruzi*) y suramina (*T. brucei*); todos se compraron a Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos. Los resultados se expresaron como concentración media inhibitoria CI_{50} determinada por regresión lineal a partir de las concentraciones evaluadas, expresados como la media de dos experimentos realizados.

2.3.3.1. Microorganismos: Las cepas de microorganismos utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Candida albicans* ATCC B59630 (azol resistente). Las bacterias fueron cultivadas en medio MHB (acrónimo del inglés Mueller Hinton Broth) y mantenidas en medio Triptona-Soya-Agar. Los hongos se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI acrónimo en inglés)-1640 (Gibco-BRL, EE.UU). Todos los cultivos y ensayos se realizaron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Las cepas fueron proporcionadas por la colección de cultivo del Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de referencia europea perteneciente a la Universidad de Amberes, Bélgica.

Para la actividad antiparasitaria se utilizaron las cepas de *Leishmania infantum* MHOM/MA (BE)/67, *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen CL2, β galactosidasa (sensible a nifurtimox), *Trypanosoma brucei* var *brucei* Squib 427 (sensible a suramina, las cuales fueron proporcionadas por el propio Laboratorio de la Universidad de Amberes. *Leishmania infantum* fue mantenida en Golden Hámster (*Mesocricetus auratus*) y las cepas de *T. cruzi* sobre células MRC-5sv2 en medio MEN, suplementado con 200 mM de L-glutamina, 16,5 mM de NaHCO₃ y 5% de suero fetal bovino. El medio Hirumi (HMI-9) fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino y se utilizó para mantener la cepa de *T. brucei* var *brucei*.

3. RESULTADOS

3.1. Parámetros farmacognósticos de las hojas

En la tabla 1 se muestran los resultados de los parámetros farmacognósticos obtenidos para las hojas de la especie *Z. fagara*.

Tabla 1. Comportamiento de la humedad residual, cenizas totales y solubles en agua y sustancias solubles para la hoja de *Z. fagara*.

H (%)	C _T (%)	C _{SA} (%)	SS (%)			
			agua	EtOH 30 %	EtOH 70 %	EtOH 95 %
11,5 ± 0,70	7,91 ± 0,04	2,64 ± 0,48	26,93 ± 0,00*	19,58 ± 0,00*	15,19 ± 0,00*	7,71 ± 0,00*

Leyenda: H, Humedad residual; C_T, Cenizas totales; C_{SA}, Cenizas solubles en agua, SS, sustancias solubles. El * encima de los números significa que existen diferencias estadísticas en las medias obtenidas para cada disolvente para un p-valor menor que 0,05 empleando el test de Mínimas y Máximas Diferencias Significativas de Tukey-HSD.

3.2. Determinación los parámetros físico-químicos, composición química cualitativa y cuantitativas al extracto hidroalcohólico

Los resultados de la determinación de los parámetros físico-químicos al extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Z. fagara* se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del extracto hidroalcohólico de hoja de *Z. fagara*.

Olor	Color	DR $\pm$ S	pH $\pm$ S (T 25 °C)	IR $\pm$ S (T 25 °C)	ST (%) $\pm$ S (mg/100 mL)
Característico	Amarillo verdoso	0,9244 $\pm$ 0,0651	5,97 $\pm$ 0,061	1,3605 $\pm$ 0,0004	21,4 $\pm$ 0,0424

Leyenda: DR (Densidad relativa), IR (Índice de refracción), ST (Sólidos totales).

En el extracto se evidenció la presencia cualitativa de alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos. Por su parte, cuantitativamente se determinó contenido tanto de fenoles como de flavonoides totales en el extracto de *Z. fagara*, obteniéndose que para el primero fue de 14,73 $\pm$ 0,26 μ g de ácido gálico/mg y en el caso del segundo fue de 3,11 $\pm$ 0,16 μ g de quercetina/mg.

3.3. Actividad antimicrobiana *in vitro*

Los resultados de actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto frente a bacterias, hongos y parásitos se muestran en la Tabla 3. Se consideró activo el extracto cuando la CI₅₀ fuera menor o igual que 100 μ g/mL [25].

Tabla 3. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de hojas de *Z. fagara* frente a bacterias, hongos y parásitos.

Bacterias y hongos CI ₅₀ μ g/mL			Parásitos CI ₅₀ μ g/mL $\pm$ S		
Ec	Sa	Ca	Tbr	Tc	Lin
>128	>128	>128	2,48 $\pm$ 1,38	13,19 $\pm$ 13,17	13,19 $\pm$ 4,29

Leyenda: Ec (*Escherichia coli*), Sa (*Staphylococcus aureus*), Ca (*Candida albicans*), Tbr (*Trypanosoma brucei*), Tc (*Trypanosoma cruzi*), Lin (*Leishmania infantum*), CI₅₀ (Concentración inhibitoria media), S (Desviación estándar).

4. DISCUSIÓN

El exceso de agua en las drogas vegetales una vez sometida a un proceso de secado puede promover el crecimiento de hongos, la presencia de insectos o provocar la hidrólisis de compuestos activos que se encuentran en el material vegetal y por consiguiente su posterior deterioro [19]. Es por ello, que los límites en el contenido de agua en el material vegetal seco deben ser determinados. La humedad residual por el método azeotrópico a las hojas de la especie *Z. fagara*, estuvo dentro de los límites establecidos por la bibliografía de referencia, la cual fue de 11,5 $\pm$ 0,70 % (Tabla 1). Lo que indica que el secado a la sombra utilizado permite que se conserve y se mantenga la calidad de estas, para ser usadas como posible materia prima, lográndose una mayor conservación por un tiempo prolongado. También se evita la proliferación de microorganismos y degradación de metabolitos que sean volátiles con una posible actividad farmacológica.

El contenido de cenizas totales fue otro de los parámetros determinados, indicativo de la calidad del material con que se trabaja y constituyen una base para definir su pureza e identidad. También brinda información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas, cuerpos extraños o la cantidad de estos elementos en su contenido [26]. El contenido de cenizas totales fue de 7,91 $\pm$ 0,04 % (Tabla 1), el cual excedió del límite permisible reportado en las Farmacopeas que es hasta el 5 % [22, 27]. Este comportamiento pudiera estar relacionado a la

presencia de cenizas fisiológicas de esta droga vegetal, que es la cantidad remanente después de la ignición del material, derivadas de los tejidos celulares [28]. Además de la posible presencia de metales alcalinos y alcalino-térreos en las hojas. Por lo que se recomienda realizar la determinación del contenido de metales en la droga seca por técnicas analítica de plasma con acoplamiento inductivo ICP. La cantidad de cenizas solubles en agua también ayudan a evaluar la pureza de la droga. Al analizar los resultados obtenidos en las hojas de *Z. fagara*, se pudo evidenciar que se haya entre $2,64 \pm 0,48$ % (Tabla 1), obteniéndose pequeños valores, lo que demuestra que una pequeña parte de las cenizas totales de esta droga presenta características polares.

Por otro lado, el ensayo de sustancias solubles evidenció que los mayores rendimientos se observan en los extractos preparados con los disolventes de mayor polaridad (agua y etanol al 30 %). No siendo así para el caso del resto de los menstruos empleados. Esto indica que las sustancias extraídas tienen un alto índice de polaridad. Según el análisis de varianza multifactorial realizado, existen diferencias estadísticas y numéricas en todos los menstruos utilizados, obteniéndose un p-valor menor que 0,05 (0,0000), con un nivel del 95,0 % de confianza. Teniendo en cuenta que los disolventes que resultaron ser mejores en la extracción de sustancias solubles no fueron estables microbiológicamente durante la preparación del extracto, se seleccionó el etanol al 70 % como el mejor menstruo, donde se garantiza la extracción de sustancias y la estabilidad del extracto, pues se evita la proliferación de microorganismos.

Partiendo de estos resultados se obtuvo un extracto hidroalcohólico a partir de las hojas secas de *Z. fagara* por el método de extracción de percolación y como disolvente etanol al 70%. Dentro de los parámetros físico-químicos determinados al extracto total de las hojas de *Z. fagara* (Tabla 2), se encuentran las características organolépticas, las cuales varían en los diferentes preparados farmacéuticos en dependencia del modo de preparación. En este caso al tratarse de un extracto total los parámetros evaluados fueron el color y el olor. Este presentó un olor característico propio de la especie y un color amarillo verdoso, que va en correspondencia con el que adquieren las hojas una vez que se secan. Otro de los parámetros determinados fue la densidad relativa, la cual fue de $0,9244 \pm 0,0651$ relacionando este resultado obtenido con la densidad del agua, ambas se determinaron a la misma temperatura (T 25 °C). También se determinó el valor del pH el cual fue de $5,97 \pm 0,061$ siendo ligeramente ácido. Este comportamiento pudiera estar relacionado con la presencia de algunos metabolitos que le aportan acidez como: fenoles, taninos y flavonoides, los cuales presentan en su estructura un grupo hidroxilo, que es el responsable de aportar la ligera acidez.

El índice de refracción (n) de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es valioso en la identificación de sustancias y en la detección de impurezas [29]. Se determinó el índice de refracción dando un valor de $1,36 \pm 0,0004$ a una temperatura de 25 °C conociendo de esta manera el número de impurezas presentes y la transparencia del extracto. Los sólidos totales fueron de $21,4 \pm 0,042$ mg/100 mL; el cual puede ser utilizado como criterio de concentración para ensayos biológicos. Todas estas determinaciones constituyen los primeros parámetros físico-químicos de calidad a monitorear durante el proceso extractivo de las hojas de *Z. fagara*.

Los resultados de la composición química cualitativa muestran coincidencia con los descritos en otras investigaciones de *Z. fagara* pero en otros órganos. Como por ejemplo en el extracto etanólico de la corteza seca obtenido por el método de percolación con etanol al 96 %, se detectó la presencia de alcaloides flavonoides, fenoles y taninos, principalmente [17, 30-32]. También se han aislado del extracto etanólico obtenido de la corteza (estado fresco) estos mis-

mos metabolitos excepto flavonoides [17]. Y por último en los frutos de *Z. fagara* se han identificado como compuestos mayoritarios del aceite esencial el D-germacreno-4-ol, elemol y α -cadinol [6].

Para otras especies del género *Zanthoxylum*, resultan comunes los informes sobre la presencia de los mismos tipos de metabolitos. Dentro de los que podemos citar a los alcaloides, los cuales son los compuestos más relevantes, ya que se han aislado en la mayoría de las especies de este género y en todos los órganos de las plantas, por lo que son considerados marcador quimiotaxonómico para el género. La literatura científica consultada, reporta estudios en los frutos de *Z. coriaceum* y en la corteza del tallo de *Z. elephantiasis* y *Z. martinicense* a partir de los cuales se han aislado alcaloides del tipo quinolona, quinolina y benzofenantridina [30]. También se han determinado alcaloides en la especie *Zanthoxylum pistacciifolium* Griseb [20]. Los triterpenos son otros de los metabolitos que resultan comunes en la mayoría de las especies del género, especialmente el compuesto conocido como lupeol [6-8]. En el género *Zanthoxylum* se han aislado flavonoides glicosilados derivados de flavonol, flavonoles, flavonas y flavanonas [7, 8].

En sentido general, las pruebas químicas cualitativas realizadas, sugieren que los principales metabolitos presente en las hojas de la especie estudiada son: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos, muchas de las cuales coinciden con estudios anteriores realizados en otras especies.

Para esta planta no existen reportes del contenido de fenoles ni de flavonoides totales de ahí que partiendo del resultado químico cualitativo se determinó el contenido de estos grupos de metabolitos por métodos espectrofotométricos. No obstante, existen reportes en otros órganos de especies del género *Zanthoxylum*, donde se han podido cuantificar ambos metabolitos. Tal es el caso de los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo a partir de la corteza del tallo de *Zanthoxylum alatum*, obteniéndose valores máximos del contenido de fenoles totales de 5,12 y 4,36 mg/g de ácido gálico respectivamente [33, 34] Para esta misma especie se realizó otro estudio en el 2016, donde el contenido de fenoles y flavonoides totales en un extracto metanólico fue de $89,2 \pm 0,59$ mg/g y $63,8 \pm 0,34$ mg/g respectivamente [35]. También extractos en metanol ($59,34 \pm 0,13$ mg/g de ácido gálico) y acetona ($34,24 \pm 0,25$ mg/g de ácido gálico) de las frutas del *Zanthoxylum armatum* han presentado un alto contenido de fenoles totales. Mientras que el contenido de flavonoides fue de $0,82 \pm 0,03$ mg/g de quercetina [36].

En los tres estudios los valores reportados tanto de fenoles como de flavonoides totales resultaron ser superiores a los obtenidos en esta investigación, aunque hay que tener en cuenta que se utilizaron otros órganos de la planta diferentes al que se utilizó en *Z. fagara*. Y en dependencia del órgano que se utilice el contenido de los metabolitos secundarios puede variar, ya que ellos se acumulan en dependencia de las necesidades fisiológicas de las plantas. Además, en la producción de estos pueden influir tanto factores extrínsecos como intrínsecos [37]

Las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias, hongos, virus y parásitos todavía son una amenaza mayor en la salud pública, a pesar del gran progreso en la medicina humana. Además de la resistencia antimicrobiana, ya que los microorganismos la han creado a través de mutaciones genéticas y otros mecanismos de resistencia. Siendo de gran importancia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas como es el caso de extractos o sustancias puras aisladas de plantas medicinales.

Uno de los géneros que está constituido por especies con diversas propiedades farmacológicas es el *Zanthoxylum*. En el cual se han demostrado propiedades antimicrobianas del *Z. americanum* [38], *Z. leprieurii*, *Z. xanthoxyloides* [39], *Z. martinicense*, *Z. elephantiasis* [40], *Z.*

acanthopodium, *Z. articulatum* [41], *Z. monophyllum*, *Z. usambarense* [42], *Z. guilletii* [43], *Z. armatum* [43, 44].

El extracto evaluado no resultó activo frente a las cepas de las bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) y del hongo ensayado (*Candida albicans*). Estos resultados no coinciden con reportes realizados por varios autores donde un extracto etanólico obtenido de la corteza de esta especie se evaluó frente a *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Microsporium canis* y *Trichophyton mentagrophytes* y exhibió buena actividad antifúngica, en comparación con los otros extractos evaluados de otras especies de *Zanthoxylum* [17].

En otro estudio se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de esta misma especie frente a diferentes cepas gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio cholerae* caso clínico) y gram-positivas (*Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus epidermidis*), utilizando el método de difusión en agar. El mismo presentó inhibición para las cepas de *B. subtilis* (17 mm), *V. cholerae* El Tor (11 mm), *V. cholerae* caso clínico (10 mm) y *S. epidermidis* (9 mm) [43]. Para otras especies del género se ha demostrado la actividad antibacteriana y antifúngica. Los extractos metanólicos obtenidos de frutas, semillas y corteza de *Z. armatum* fueron evaluado *in vitro* contra 9 cepas bacterianas diferentes. Los extractos exhibieron notables propiedades antibacterianas, lo que sugiere el uso potencial de esta planta para el tratamiento de diferentes enfermedades bacterianas como infección de la piel, infección del tracto urinario, problemas dentales, diarrea, y disentería [32].

En una investigación realizada a extractos preparados a partir de las hojas de las especies *Zanthoxylum holtizianum* y *Zanthoxylum lindense*, se evidenció que ambos extractos presentaron menor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos que los obtenidos a partir de la corteza y la raíz. Además, de ser el *Staphylococcus aureus*, la bacteria más susceptible con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 2,5-0,625 mg/mL [45]. Por su parte un estudio conducido por Díaz y colaboradores evidenció la buena actividad de las hojas de *Z. pistaciifolium* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* [46].

En contraste a lo observado en la actividad antibacteriana y antifúngica, el extracto de mostró una potente actividad antiprotozoaria frente a todas las cepas de parásitos evaluadas (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei*), pues se obtuvieron IC₅₀ menores que 100 µg/mL [25]. En las dos primeras, se obtuvieron las mismas IC₅₀= 13,19 µg/mL; lo que demuestra que ambas tuvieron la misma sensibilidad frente al extracto. La cepa *Trypanosoma brucei*, de las tres fue la que mayor sensibilidad presentó. Estos resultados evidencian la presencia en las hojas de *Z. fagara* de posibles compuestos que pudieran afectar directamente a los parásitos o estimular mecanismos en las células hospederas para su eliminación. Dentro de estos compuestos se pueden mencionar: a los alcaloides y aceites esenciales, los cuales se identificaron cualitativamente en el extracto.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde numerosos estudios muestran la actividad frente a protozoo para varias especies de *Zanthoxylum* tanto de extractos como compuestos aislados [47]. El extracto de acetato de etilo de la corteza del tallo de *Z. chalybeum* fue activo contra cepas sensibles y resistentes de *Plasmodium falciparum*. En estudios *in vitro*, el extracto etanólico y la fracción de hexano de la corteza del tallo de *Z. rhoifolium* mostraron actividad contra promastigotes de *Leishmania amazonensis* en 24, 48 y 72 h de tratamiento. En el mismo estudio, los alcaloides queleritrina y nitidina, aislados de *Z. rhoifolium*, mostraron actividad contra las formas amastigotes. El extracto de hojas de *Z. chiloperone* fue sensible a la cepa *Trypanosoma cruzi*, pues ocurrió la lisis total de esta a una IC₅₀ de 900 µg/mL, la cual fue superior a la que se obtuvo en este estudio contra este mismo parásito. De esta

misma especie, se aisló de extractos etanólicos obtenidos de las hojas, los frutos, la corteza y la raíz, el alcaloide 6-cantinona y algunos de sus análogos, los cuales también presentaron efecto contra *Trypanozoma* sp [48].

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta por primera vez los índices farmacognósticos de las hojas de la especie *Z. fagara* lo cual sirve de patrón de calidad preliminar. Los resultados de la composición química revelan la presencia de metabolitos bioactivos de interés para el género tales como: alcaloides, aceites esenciales y compuestos fenólicos. La actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de las hojas de *Z. fagara*, demostró una potente actividad frente a parásitos, no así frente a bacterias y hongos evaluados. El estudio revela por primera vez el potencial de las hojas de la especie para el aislamiento de compuestos con actividad antiprotozoaria.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés

AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestros agradecimientos al Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente, al Centro de Toxicología y Biomedicina (Cuba), y al Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) (Universidad de Amberes, Bélgica) por su apoyo técnico en la realización de cada uno de los ensayos y experimentos realizados. La evaluación antimicrobiana *in vitro* es resultado de la Cooperación Belga al Desarrollo a través de VLIR-UOS en el contexto del Programa de Cooperación Universitaria Institucional con la Universidad de Oriente.

REFERENCIAS

1. S. Banerjee. Introduction to Ethnobotany and Traditional Medicine. En: A.D. Talukdar, J.K. Patra, G. Das & D. Nath (editores), *Traditional Resources and Tools for Modern Drug Discovery. Ethnomedicine and Pharmacology*. Springer, Singapore, 2024; pp. 1–30. Doi: https://doi.org/10.1007/978-981-97-4600-2_1
2. E. Salmerón-Manzano, J.A. Garrido-Cardenas & F. Manzano-Agugliaro. Worldwide research trends on medicinal plants. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, **17**(10), 3376 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
3. P.K. Mukherjee, S. Banerjee, B.D. Gupta & A. Kar. Evidence-based validation of herbal medicine: Translational approach. En P.K. Mukherjee (editor). *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Translational Research on Botanicals*. Elsevier, 2022; pp. 1–41. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00025-1>
4. H. Siddique, B. Pendry, M.A. Rashid & M.M. Rahman. Medicinal plants used to treat infectious diseases in the central part and a northern district of Bangladesh – An ethnopharmacological perception. *J. Herb. Med.*, **29**, 100484 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100484>
5. M. Rabi. The global (health) governance of antimicrobial resistance. *Globalizations*, **21**(8), 1518–1538 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1080/14747731.2024.2375455>

6. L.O.J. Patiño, R.J.A. Prieto & S.L.E. Cuca, *Zanthoxylum* genus as potential source of bioactive compounds. En: I. Rasooli (editor). *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. IntechOpen, London, 2012; pp. 185–218. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/25790>
7. J.O. Ombito. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Zanthoxylum* (Rutaceae): a review. *J. Nat. Prod.*, **11**(1), 21–43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2174/2210315509666191202095924>
8. I.U. Okagu, J.C. Ndefo, E.C. Aham & C.C. Udenigwe. *Zanthoxylum* species: a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacological and nutraceutical applications. *Molecules*, **26**(13), 4023 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26134023>
9. I.U. Okagu, J.C. Ndefo, E.C. Aham & C.C. Udenigwe, *Zanthoxylum* species: a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology in relation to cancer, infectious diseases and sickle cell anemia. *Front. Pharmacol.*, **12**, 713090 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.713090>
10. E.S. Mutinda, F. Kimutai, E.M. Mkala, E.N. Waswa, W.O. Odago, C. Nanjala, *et al.* Ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacology of pantropical genus *Zanthoxylum* L. (Rutaceae): An update. *J. Ethnopharmacol.*, **303**, 115895 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115895>
11. P. Acevedo-Rodríguez & M.T. Strong. *Catalogue of seed plants of the West Indies*. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington, D.C., 2012; p. 859. Doi: <https://doi.org/10.5479/si.0081024X.98.1>
12. J.M. Amaro-Luis, F.R. Fronczek, G.M. Massanet, E. Pando, F. Rodríguez-Luis, S.F. Watkins & E. Zubía. Meridinol, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. *Phytochemistry*, **27**(12), 3933–3935 (1988). Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83048-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83048-6)
13. J.T. Roig. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Editorial Científico-Técnica, La Habana, 2012; pp. 736–737.
14. F. Stermitz, M. Caolo & J. Swinehart. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phytochemistry*, **19**(7), 1469–1472 (1980). Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)80197-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)80197-X)
15. J.A. Prieto, O.J. Patiño, W.A. Delgado, J.P. Moreno & L.E. Cuca. Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. *Chil. J. Agric. Res.*, **71**(1), 73–82 (2011). URL: <https://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v71n1/at09.pdf>
16. W.N. Setzer, J.M. Schmidt, L.C. Eiter & W.A. Haber. The leaf oil composition of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. from Monteverde, Costa Rica, and its biological activities. *J. Essent. Oil Res.*, **17**(3), 333–335 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698923>
17. R. Diéguez-Hurtado, G. Garrido-Garrido, S. Prieto-González, Y. Iznaga, L. González, J. Molina-Torres, M. Curini, F. Epifano & M.C. Marcotullio. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*, **74**(4), 384–386 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00048-0)
18. Q. Li, Z. Chen, L. Zeng, Y. Bi, F. Kong, Z. Wang & S. Tan. Characterization, in-vitro digestion, antioxidant, anti-hyperlipidemic and antibacterial activities of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim essential oil nano-emulsion. *Food Biosci.*, **56**, 103082 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103082>
19. World Health Organization. *Quality Control Methods for Herbal Materials*. WHO, Geneva, Switzerland, 2011; pp. 23–37. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241500739>
20. Y.H. Díaz, J.C. Escalona, R.G. Fernández, A.O. Pacheco, J.G. Díaz, L.M. Fidalgo, D.G.J. Batista, C.F. da Silva & P. Cos. Trypanocidal potentialities of skimmianine an alkaloid isolated from *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb leaves. *Pharmacognosy Res.*, **12**(3), 322–327 (2020). URL: <https://phcogres.com/article/2020/12/3/104103prpr4419>
21. C.A. Berenguer-Rivas, M. Mas-Ortiz, P.L. Batista-Corbal, J. Costa-Acosta & J.C. Escalona-Arranz. Chemical composition and *in-vitro* antioxidant activity of extracts of *Adelia ricinella* L. *Rev. Cub. Quim.*, **30**(2), 191–210 (2018). URL: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n2/ind02218.pdf>
22. BP. *British Pharmacopoeia*. Her Majesty Stationery Office, London, 2016.
23. Z. Jia, M. Tang & J. Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and theirs scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, **64**(4), 555–559 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

24. J. García-Díaz, E. Tuentler, J.C. Escalona-Arranz, G. Llauradó-Maury, P. Cos & L. Pieters. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. *J. Ethnopharmacol.*, **236**, 250–257 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.049>
25. P. Cos, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe & L. Maes. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.*, **106**, 290–302 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
26. I. Márquez-Hernández, T.L. Bastidas-Guerrero, G.K. Fernández-Valarezo, M. Campo-Fernández, C.G. Jaramillo-Jaramillo & L. Rojas de Astudillo. Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa Oleífera* lam cosechada en Machala. *Rev. Cubana Plant. Med.*, **22**(1), 1-8 (2017). URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla13117.pdf>
27. Z.-C. Lou. *General Control Methods for Vegetable Drugs. Comparative Study of Methods Included in Thirteen Pharmacopoeias: A Proposal on Their International Unification*. WHO/PHARM/80.502, Geneva, Switzerland, 1980; pp. 8–39.
28. M. Miranda & A. Cuéllar. *Farmacognosia y Química de Productos Naturales*. Editorial Félix Varela, La Habana, 2012; pp. 127-130, 135-147, 161-166, 186, 207, 251, 259, 276, 291-295, 292, 306, 316, 357, 664.
29. FEU/FN. *Farmacopea de los Estados Unidos - Formulario Nacional*. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville (MD), 2015; p. 440.
30. L. Márquez, J. Agüero, I. Hernández, G. Garrido, I. Martínez, R. Diéguez, S. Prieto, Y. Rivas, J. Molina-Torres, M. Curini & R. Delgado. Antiinflammatory evaluation and phytochemical characterization of some plants of the *Zanthoxylum* genus. *Acta. Farm. Bonaerense*, **24**(3), 325–330 (2005). URL: http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP_24_3_1_1_7XMY82Z17U.pdf
31. V.E. Macías-Villamizar, E.D. Coy-Barrera & L.E. Cuca-Suárez. Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. (Rutaceae). *Rev. Cubana Plant. Med.*, **16**(1), 43–53 (2011). URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla05111.pdf>
32. V.E. Macías, E.D. Coy B. & L.E. Cuca. Novel furocarbazole alkaloids and antibacterial activity of ethanol extract from *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. *Rev. Colomb. Quim.*, **39**(3), 333–341 (2010). URL: <http://scielo.org.co/pdf/rcq/v39n3/v39n3a03.pdf>
33. M. Mukhija & K. Nath. Antioxidant potential and total phenolic content of *Zanthoxylum alatum* stem bark. *J. Appl. Pharm.*, **6**, 388–397 (2014). <http://dx.doi.org/10.21065/19204159.6.4.357>
34. M. Mukhija, S.M. Pal, D.K. Lal & K.A. Nath. Cytotoxic and antioxidant activity of *Zanthoxylum alatum* stem bark and its flavonoid constituents. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **4**(4), 86-92 (2015). URL: <https://www.phytojournal.com/archives/2015/vol4issue4/PartB/4-3-66.pdf>
35. I. Karmakar, S. Haldar, M. Chakraborty, S. Dewanje & P.K. Haldar. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of Zanthonitrile isolated from *Zanthoxylum alatum*. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **6**(6), 119–122 (2016). Doi: <https://doi.org/10.7324/japs.2016.60621>
36. T. Seal, K. Chaudhuri & B. Pillai. Antioxidant activity of some selected wild edible fruits of North-Eastern region in India and effect of solvent extraction system. *Global J. Environ. Res.*, **6**(3), 84–90 (2012). URL: [https://idosi.org/gjer/gjer6\(3\)12/2.pdf](https://idosi.org/gjer/gjer6(3)12/2.pdf)
37. N. Verma & S. Shukla. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.*, **2**(4), 105–113 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jar-map.2015.09.002>
38. Y.N. Bafi, J.T. Arnason, J. Baker & M.L. Smith. Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine*, **12**(5), 370–377 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.005>
39. A.N. Nganea, L. Biyiti, P.H. Amvam-Zollo & P. Bouchet. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum lepreurii* Guill. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. *J. Ethnopharmacol.*, **70**(3), 335–342 (2000). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00188-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00188-9)
40. L. Ishwori, D.T. Anupam, P.K. Singh, C.M. Dutta & N. Deepa. Antibacterial activity of some selected plants traditionally used as medicine in Manipur. *Afr. J. Biotechnol.*, **13**(13), 1491–1495 (2014). URL: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/118555>

41. F.F.G. Rodrigues, J.G.M. Costa & H.D.M. Coutinho. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. *Indian. J. Med. Res.*, **131**, 833–835 (2010). URL: https://journals.lww.com/ijmr/Citation/2010/31060/Enhancement_of_the_antibiotic_activity_of.17.aspx
42. E.N. Matu & J.V. Staden. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, **87**(1), 35–41 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00107-7)
43. S.S. Kumar, R. Vishnoi, G.D. Kumar & K. Kishor. Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India. *J. Appl. Nat. Sci.*, **4**(1), 47–50 (2012). Doi: <https://doi.org/10.31018/jans.v4i1.220>
44. J.S. Negi, V.K. Bisht, A.K. Bhandari, R. Bisht & N.S. Kandari. Major constituents, antioxidant and antibacterial activities of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil. *Iran. J. Pharmacol. Ther.*, **11**(2), 68–72 (2012). URL: https://www.researchgate.net/publication/236328087_Major_constituents_antioxidant_and_antibacterial_activity_of_Zanthoxylum_armatum_DC_essential_oil
45. N. Phuyal, P.K. Jha, P.P. Raturi & S. Rajbhandary. *In vitro* antibacterial activities of methanolic extracts of fruits, seeds, and bark of *Zanthoxylum armatum* DC. *J. Trop. Med.*, **2020**(1), 2803063 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1155/2020/2803063>
46. D.K.B. Runyoro, O.D. Ngassapa, P. Masimba & B. Peter. Antimicrobial activity of *Zanthoxylum holizianum* (Engl.) Waterm and *Zanthoxylum lindense* (Engl.) Kokwaro growing in Bagamoyo District, Coast region, Tanzania. *J. Pharm. Sci. Res.*, **9**(1), 49–54 (2017). URL: <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol9Issue01/jpsr09011711.pdf>
47. Y. Heredia-Díaz, J.C. Escalona-Arranz, A. Ochoa-Pacheco, R. González-Fernández, P.L. Batista-Corbal, P. Cos & A. Escalona-Caparros. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of a "lipid phase" from *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb leaves, *Acta. Pharm. Sci.*, **61**(3), 269–284 (2023). URL: https://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf_782.pdf
48. J. Correa-Barbosa, D.F. Sodré, P.H.C. Nascimento & M.F. Dolabela. Activity of the genus *Zanthoxylum* against diseases caused by protozoa: A systematic review. *Front. Pharmacol.*, **13**, 873208 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.873208>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R. González-Fernández, Y. Heredia-Díaz, J.C. Escalona-Arraz, Y. Ramos-Domínguez, P. Cos & J. García-Díaz. Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 160–174 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115477>

Artículo de revisión

Como ser un cazador de impurezas en las sustancias activas: Una metodología y casos de estudio

Juan Carlos Ortiz Lara

Sintenovo, S.A. de C.V. Calle 13 Este n° 3 62578 Civac, Jiutepec, Estado de Morelos, México.

Correo electrónico: jcortiz@sintenovo.com.mx

Recibido: 19 de julio de 2024

Corregido: 24 de enero de 2025

Aceptado: 28 de enero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119554>

RESUMEN

Introducción. El contenido de impurezas en las sustancias activas y formas farmacéuticas es un tópico de suma importancia ya que un alto contenido de subproductos podría poner en riesgo a la población. En función del conocimiento de la estructura se tienen diferentes límites. Por lo tanto, es mandatorio conocer el origen y las estructuras químicas de las impurezas con objeto de poder limitarlas. En lo que respecta a los procesos de fabricación, siempre hay una pequeña posibilidad de que algún proceso tenga una excursión en alguna variable ya sea por error humano o por falla en algún equipo. **Intención.** Por lo tanto, es necesario saber cómo gestionar este tipo de problemáticas y lo más importante evitar reincidencias. Para lograr este objetivo es necesario desarrollar una metodología que brinde una pauta seguir. El conocimiento de la estructura, así como una investigación de carácter científico ayudara a proponer las medidas correctivas operativas adecuadas para evitar la recurrencia y poder continuar la fabricación de producto que cumpla con las normativas y especificaciones vigentes. La implementación de acciones que deriven en el rápido control de las problemáticas es de capital importancia para la industria farmacéutica con el objetivo tener medidas alternativas de control y seguir fabricando ya que los pacientes esperan esas medicinas. **Resultados.** En esta revisión se presenta una metodología para elucidar impurezas orgánicas ya sea en las sustancias activas o en las formas farmacéuticas. Se presentarán diez casos teóricos y se ejemplificará con casos similares descritos en la literatura. También se comentarán las principales herramientas utilizadas para realizar investigaciones. Así mismo, se brindará una perspectiva de los avances analíticos utilizados para elucidar impurezas. Finalmente, se comentarán algunas propuestas de control.

Palabras claves: Impurezas; elucidación; sustancias activas; formas farmacéuticas; investigación; control.

SUMMARY

How to be an impurity hunter in the pharmaceutical ingredients: a methodology and study cases

Introduction. The content of impurities in active substances and pharmaceutical forms is a very important topic since a high content of byproducts could put the population at risk. Depending on the knowledge of the structure, there are different limits. Therefore, it is mandatory to know the origin and chemical structures of the impurities in order to limit them. When it comes to manufacturing processes, there is always a small possibility that a process may have an excursion in some variable either due to human error or equipment failure. **Intention.** Therefore, it is necessary to know how to manage this type of problem and, most importantly, avoid recurrence. To achieve this objective, it is necessary to

develop a methodology that provides a guideline to follow. Knowledge of the structure, as well as scientific research, will help propose appropriate operational corrective measures to avoid recurrence and be able to continue manufacturing a product that complies with current regulations and specifications. The implementation of actions that lead to the rapid control of problems is of capital importance for the pharmaceutical industry with the objective of having alternative control measures and continuing to manufacture since patients expect these medicines. **Results.** In this review, a methodology is presented to elucidate organic impurities either in active substances or in pharmaceutical forms. Ten theoretical cases will be presented and exemplified with similar cases described in the literature. The main tools used to carry out research will also be discussed. Likewise, a perspective of the analytical advances used to elucidate impurities will be provided. Finally, some control proposals will be commented.

Keywords: Impurities; elucidation; pharmaceutical ingredients; pharmaceutical dosage forms; investigation; control.

RESUMO

Como ser um caçador de impurezas em substâncias ativas: uma metodologia e estudos de caso

Introdução. O teor de impurezas em substâncias ativas e formas farmacêuticas é um tema de extrema importância, uma vez que um elevado teor de subprodutos pode colocar a população em risco. Dependendo do conhecimento da estrutura, existem diferentes limites. Portanto, é obrigatório conhecer a origem e as estruturas químicas das impurezas para limitá-las. Quando se trata de processos de fabricação, sempre existe uma pequena possibilidade de que um processo possa sofrer uma excursão em alguma variável, seja por erro humano ou falha de equipamento. **Intenção.** Por isso, é preciso saber administrar esse tipo de problema e, o mais importante, evitar a recorrência. Para atingir este objetivo é necessário desenvolver uma metodologia que forneça uma diretriz a seguir. Os conhecimentos da estrutura, bem como a investigação científica, ajudarão a propor medidas corretivas operacionais adequadas para evitar recorrências e poder continuar a fabricar um produto que cumpra as normas e especificações vigentes. A implementação de ações que levem ao rápido controle dos problemas é de capital importância para a indústria farmacêutica com o objetivo de ter medidas alternativas de controle e continuar a fabricar uma vez que os pacientes esperam estes medicamentos. **Resultados.** Nesta revisão é apresentada uma metodologia para elucidar impurezas orgânicas tanto em substâncias ativas quanto em formas farmacêuticas. Serão apresentados dez casos teóricos e exemplificados com casos semelhantes descritos na literatura. Também serão discutidas as principais ferramentas utilizadas para a realização de pesquisas. Da mesma forma, será fornecida uma perspectiva dos avanços analíticos utilizados para elucidar as impurezas. Por fim, serão comentadas algumas propostas de controle.

Palavras-chave: Impurezas, elucidação, substâncias ativas, formas farmacêuticas, pesquisa, controle

1. INTRODUCCIÓN

El contenido de impurezas orgánicas presentes en las sustancias activas y/o formas farmacéuticas es un tópico de gran importancia, principalmente porque las impurezas no aportan ningún beneficio terapéutico. De hecho, la definición de una impureza según la ICHQ3B menciona lo siguiente: Una impureza es cualquier componente que no sea la sustancia activa o los excipientes [1]. Por lo tanto, dentro de esta categoría entran toda una serie de sustancias tales como reactivos, catalizadores, disolventes residuales, materias primas, lixiviados, partículas extrañas, etc.

El impacto de las impurezas en las sustancias activas o formas farmacéuticas es crítico ya que dependiendo de su naturaleza pueden llegar a ser muy tóxicas (impureza genotóxica) que incluso sea motivo de retirada del medicamento del mercado. Esto sucedió recientemente para

una formulación de Valsartan ya que el medicamento se contaminó con *N*-Nitrosodimetilamina que es una sustancia cancerígena y se tuvo que retirar del mercado [2]. El siguiente caso es el del Nelfinavir el cual en 2007 se tuvo que recoger debido a la presencia de una impureza genotóxica [3]. Otro importante ejemplo es el del Ritonavir en el cual un polimorfo no esperado detuvo el lanzamiento del producto. Después de una investigación se determinó que la impureza correspondía a un nuevo polimorfo que se denominó forma II [4]. El último ejemplo es el dramático caso de la Talidomida que se comercializó en los años 70's como una mezcla racémica, en la cual el enantiómero *R* tiene un efecto sedativo y el enantiómero *S* un efecto teratogénico. Este medicamento fue el responsable de que miles de recién nacidos presentaran focomelia, caracterizada por malformaciones en brazos y piernas [5]. Estos casos son sólo una muestra del impacto de las impurezas en la industria Farmacéutica. Los argumentos antes expuestos justifican las regulaciones estrictas con respecto a las impurezas.

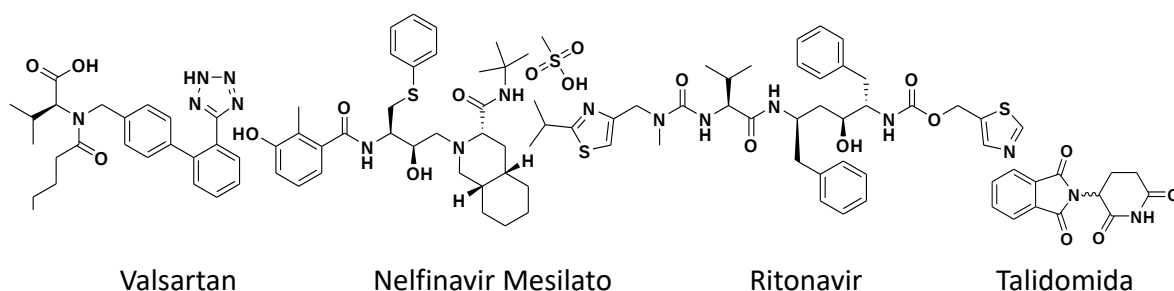


Figura 1. Principios activos con problemáticas por impurezas

En esta temática, la fabricación de fármacos está regulada en México por la norma NOM-164-SSA (Buenas prácticas de fabricación de fármacos) [6] y a nivel internacional por la ICHQ7 (Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients) [7]. Uno de los aspectos esenciales en la fabricación de sustancias activas es el control de los procesos y en consecuencia control de los subproductos generados. Para lograr que las sustancias activas sean seguras, las agencias regulatorias establecieron guías adicionales que controlan y limitan el contenido de impurezas en las sustancias activas, principalmente porque estos compuestos no tienen un efecto terapéutico. Hay diferentes tipos de impurezas que se deben controlar, por ejemplo, las impurezas orgánicas y de degradación que se regulan por la ICHQ3A [8], este tipo de impurezas son las que se generan durante el proceso de fabricación. En general se pueden clasificar en: materiales de inicio, intermediarios remanentes, biscompuestos, productos de sobre-reacción, interacción, impurezas quirales, tautoméricas, entre otras. Otras sustancias consideradas contaminantes son los disolventes residuales los cuales también son considerados impurezas ya que tampoco aportan ningún efecto terapéutico. Los disolventes orgánicos están clasificados en función de su toxicidad y son controlados por la guía ICHQ3C (Guideline for residual solvents) [9]. Esta guía divide a los disolventes en 4 clases en función de su toxicidad siendo la clase 3 la más apta para utilizarse en la fabricación de sustancias activas. Algunos ejemplos pertenecientes a esta clase son: la acetona, acetato de etilo, heptano, terbutilmetiléter, dimetilsulfóxido, etc. Por su parte la guía ICHM7 [10] clasifica y regula a las impurezas genotóxicas las cuales son impurezas que pueden dañar a nivel de ADN. En este contexto varias estructuras han sido clasificadas como potencialmente genotóxicas, dentro de estos grupos se pueden mencionar: *N*-hidroxiarilos, aminoarilos *N*-acetilados, óxidos de *N*-azarilo, aminoarilos, aldehídos, *N*-nitrosaminas, nitrocompuestos, carbamatos, époxis, aziridines, hidracinas, aceptores de Michael, haloalquenos, etc. [11].

Por su parte, la guía ICHQ3D [12] se encarga de regular las impurezas elementales, en esta guía se establecen los límites de aceptación en función de las vías de administración y se clasifican en función de su toxicidad, las principales fuentes de aportación de impurezas metálicas (catalizadores, reactivos, equipos productivos, entre otros) y se propone la evaluación del contenido y la decisión de ejecución del análisis de las impurezas elementales con base en un análisis de riesgo [13]. Finalmente, la NOM-059-SSA (Buenas prácticas de fabricación de medicamentos) [14] en México y a nivel internacional la guía ICHQ3B (Impurities in new drug products) [1] regula las impurezas en las formas farmacéuticas. En la figura 2 se compilan las guías asociadas al control de impurezas en las sustancias activas y formas farmacéuticas.

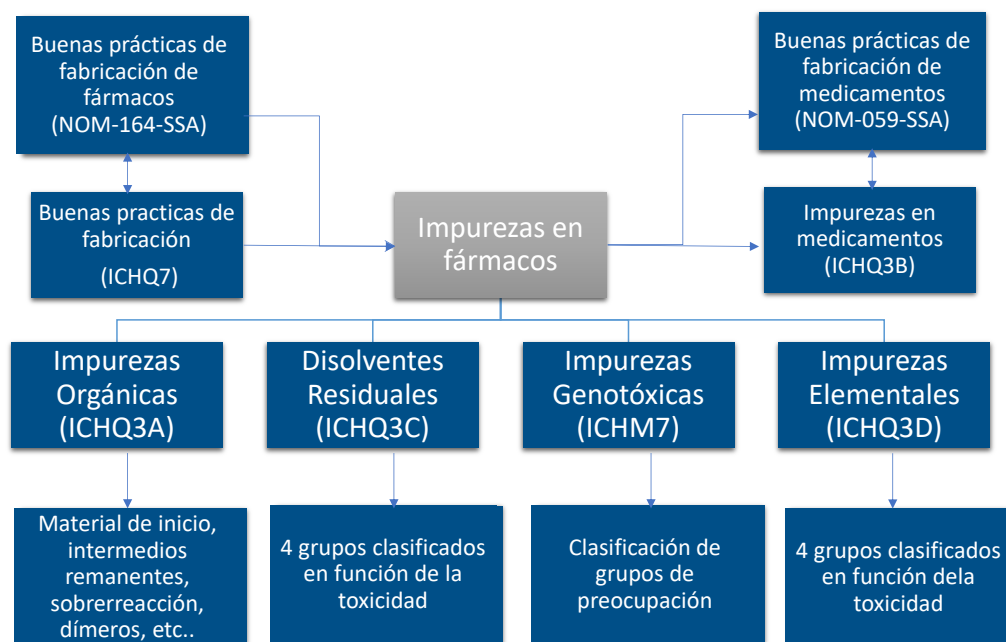


Figura 2. Guías ICH y SSA para el control de las impurezas en sustancias activas y medicamentos

Aunque ha habido un gran desarrollo de tecnología asociado al control de las impurezas, en ocasiones se presenta algún problema durante los procesos ya sea por falla de un equipo o error humano. Por ejemplo, en los procesos de fabricación se tienen que controlar proporciones de materias primas, temperatura, agitación, tiempos de reacción, desactivación de reactivos, tiempos de secado, tamaño de partícula, etc. Todos estos parámetros tienen un rango de trabajo y cuando la variable en cuestión sufre una excursión, es decir sale del rango establecido, potencialmente podría generarse una impureza. Por lo tanto, en caso de que una impureza se genere en un proceso determinado es importante disponer de alguna metodología para poder elucidar la estructura, minimizar el impacto que puede tener en diversos estadios del proyecto. Principalmente, por que la sustancia o el medicamento no estarían disponible para aliviar las enfermedades de los pacientes. Así que es necesario “cazar” la impureza lo más rápido posible con objeto de minimizar el impacto de esta problemática. Esta revisión propone una metodología para determinar la estructura de las impurezas generadas en el proceso de fabricación de las sustancias activas debido a potenciales excursiones de las condiciones de reacción, así mismo se citan ejemplos descritos en la literatura.

2. IMPACTO DE LAS IMPUREZAS EN LOS PROCESOS DE FABRICACIÓN

En la fabricación de sustancias activas y de las formas farmacéuticas se utilizan protocolos bien establecidos, tales como hojas u órdenes de fabricación regidos bajo un sistema de Calidad y siguiendo las Buenas Prácticas de Fabricación. A pesar de seguir las buenas prácticas de fabricación al pie de la letra en ocasiones existen problemáticas tales como: la falla de un equipo, un corte energético o un error humano que podrían llevar a la excursión de una variable en un proceso determinado. Como consecuencia de estas excursiones o desviaciones al proceso establecido se pueden crear impurezas. La presencia de estas puede impactar la calidad, haciendo que el producto final no cumpla con las especificaciones propuestas. Debido a la presencia de impurezas, campañas de fabricación o validaciones pueden ser detenidas hasta la elucidación del problema. Las impurezas pueden tener diversos orígenes, ya sea en el proceso de fabricación las sustancias activas [15] o en el de las formas farmacéuticas [16]. Los principales tipos se representan en la Figura 3.

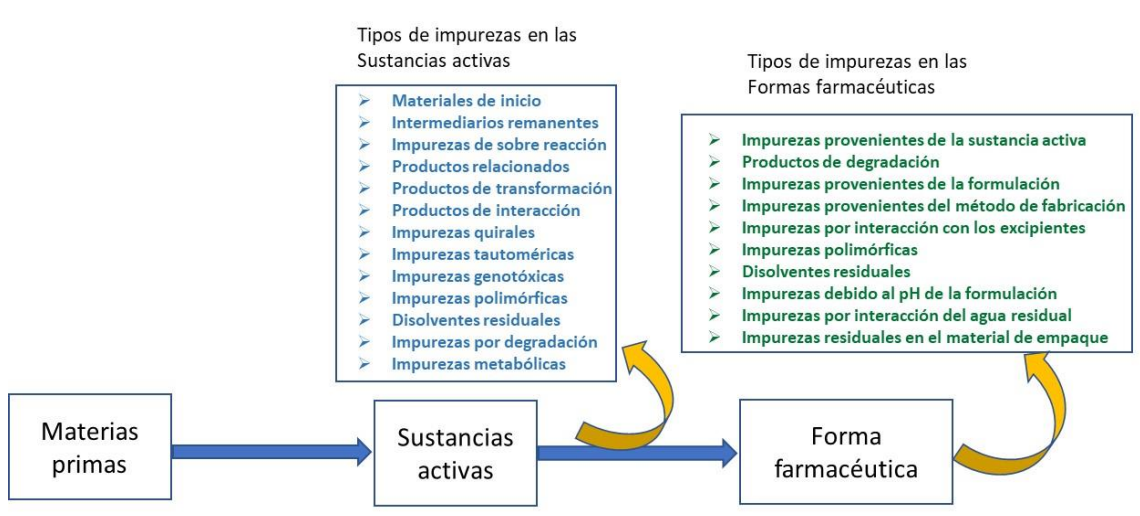


Figura 3. Tipos de impurezas orgánicas en las sustancias activas y en las formas Farmacéuticas

3. METODOLOGÍA PARA LA ELUCIDACIÓN DE UNA IMPUREZA DESCONOCIDA

En la fabricación de fármacos y las formas farmacéuticas se utilizan procedimientos bien establecidos los cuales tienen un rango de trabajo para cada operación unitaria, no obstante, en ocasiones puede haber algún problema que derive en la excursión de alguna variable. Esta desviación al proceso podría ocasionar la generación de una potencial impureza (Figura 4).

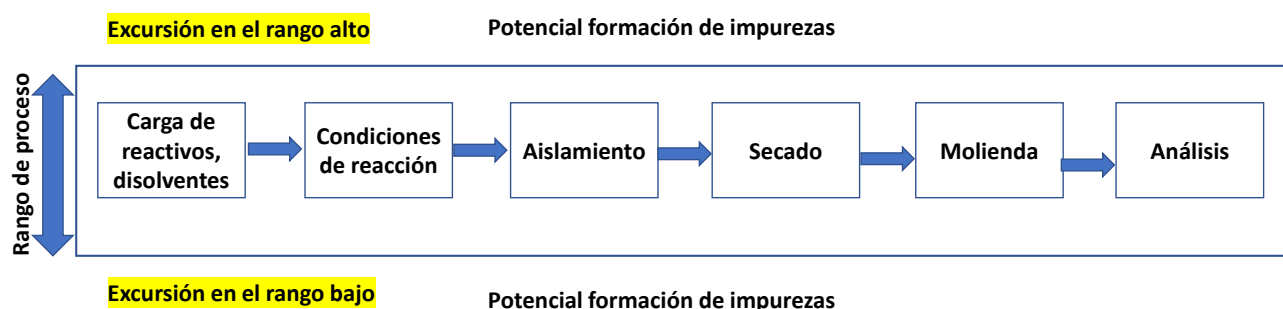


Figura 4. Excursión de una variable en un proceso de fabricación de una sustancia activa

Como se comentó previamente, una vez que se ha tenido un contratiempo que derive en un subproducto es necesario trabajar rápidamente para resolver el problema. Es por eso por lo que se necesita una guía que oriente en la resolución del inconveniente.

Para poder describir esta metodología, se parte del supuesto que durante el proceso de una sustancia activa o forma farmacéutica se obtiene una impureza en el producto aislado, por ejemplo: intermedio, sustancia activa, tableta, jarabe, etc. La impureza es debido a la excursión de una variable durante el proceso. Por una parte, es necesario saber ¿qué es lo que sucedió de diferente en el proceso? Y encontrar la causa raíz, así mismo se deben establecer acciones preventivas / correctivas para evitar recurrencia, para lo cual se deberá hacer una investigación.

Para poder llevar a cabo la tarea de elucidación, conocer el origen y poder proponer una acción correctiva es necesario plantear una metodología de trabajo.

Las etapas se resumirán a continuación y en los párrafos siguientes se describirá su desarrollo. El procedimiento es el siguiente:

1. Cuantificación de la impureza (¿cuánto hay?)
2. Trazabilidad (¿dónde se generó?)
3. Aislamiento (¿cómo se purificó?)
4. Análisis (¿qué análisis se realizaron?)
5. Elucidación estructural (¿cuál fue la estructura?)
6. Síntesis y confirmación estructural (¿es la estructura correcta?)
7. Investigación (¿qué pasó?)
8. Medidas de control (¿Cómo se evitará que suceda nuevamente?)
9. Seguimiento de las medidas de control (¿las medidas fueron efectivas? ¿Hubo reincidencia?)

La metodología se plasma en la figura 5. Por un lado, se tiene el proceso normal (casillas verdes), en segundo lugar, en caso de haber tenido una desviación al proceso y se genere una impureza (casillas azules), el producto potencialmente será rechazado. Por lo tanto, es imperativo por un lado saber qué es lo que sucedió y en segundo lugar aislar la impureza. Con estas dos actividades se podrán establecer acciones correctivas que harán que el proceso funcione correctamente y se evite reincidencia de la problemática. La parte final es hacer un seguimiento de la efectividad de las acciones correctivas para asegurar que no hay reincidencia.

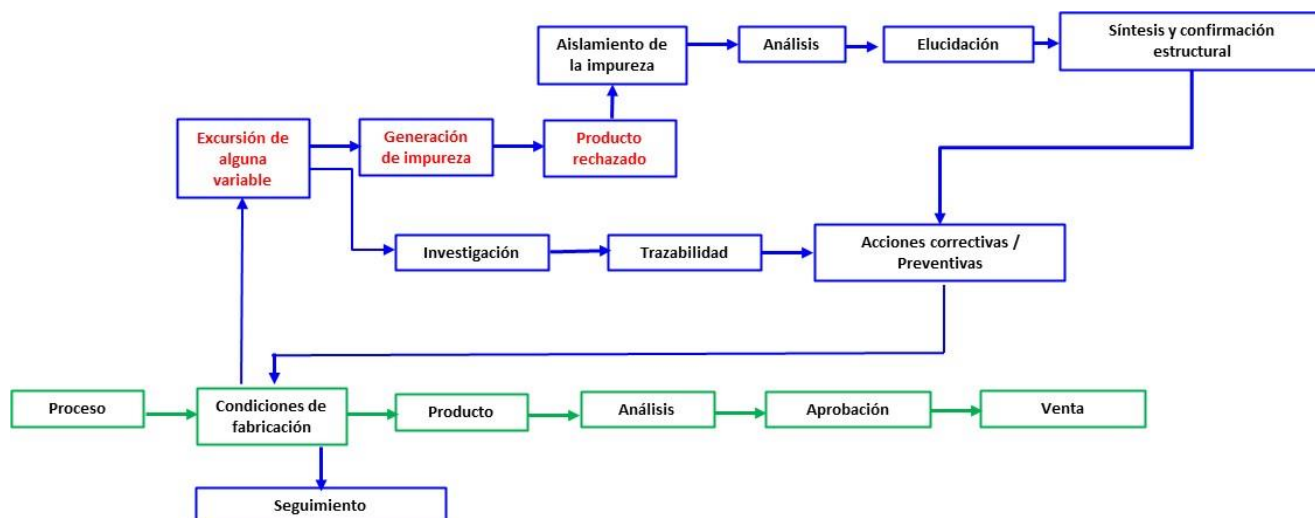


Figura 5. Metodología de aislamiento elucidación de impureza y corrección de proceso

3.1. Cuantificación de la impureza

La cuantificación de todas las impurezas presentes en un lote de producto es de capital importancia ya que en función de las cantidades presentes se puede considerar una problemática o no. En general las impurezas están limitadas a un contenido de 0.10% para las impurezas desconocidas y de 0.15% para las impurezas conocidas. En caso de que sea una impureza genotóxica los niveles de aceptación son diferentes y no está contemplada en esta aproximación [17]. Los límites antes mencionados son el baremo para decidir si una impureza se convierte en un problema. Además, es necesario remarcar que no todas las impurezas pueden elucidarse, ya que implica una inversión de recursos materiales y personal muy importante. **Por lo tanto, únicamente valores de impurezas desconocidas superiores a 0.10% deberían ser aisladas e identificadas.**

Otro factor muy importante es el factor de respuesta, que está definido como la proporción entre la señal producida por la impureza sobre la señal producida por la sustancia activa bajo las mismas condiciones de detección. El factor de respuesta está determinado por el análisis de los estándares y son usados para calcular la concentración de analitos en muestras. $RF = (\text{Respuesta de la impureza} / \text{Respuesta de la sustancia activa o intermedio})$ [18]. Evidentemente, para hacer esto se necesita aislar la impureza la cual por el momento es desconocida, está es una razón más para realizar el aislamiento. El factor de respuesta tiene una implicación directa sobre la cantidad real de un subproducto en un lote de sustancia activa. Por ejemplo, una impureza que en una primera aproximación se cuantifica en un 0.15% y si tiene un factor de respuesta de 0.3, entonces el valor real de la impureza es de $0.15\% \times 0.3 = 0.045\%$. Este valor no tendría impacto en el perfil de impurezas del lote y por lo tanto no sería objeto de rechazo.

Es necesario tener en mente que valores superiores a 0.10% de impurezas desconocidas en el producto final harían rechazar el lote mientras que en intermedios el valor límite dependerá de cómo se purifica la impureza a lo largo de la síntesis (capacidad de purga de la impureza).

Hasta este punto se han establecido límites, en la etapa siguiente es necesario determinar de origen de la impureza.

3.2. Trazabilidad

Una definición de trazabilidad es la siguiente: es un sistema designado para seguir el flujo de un producto o los atributos de un producto a través de un proceso productivo o una cadena de suministro [19]. En este contexto, trazabilidad es hacer un seguimiento de todo el proceso para conocer el origen de la impureza. Es decir, necesitamos encontrar el momento y el proceso donde se creó. Para llevar a cabo esta actividad se tiene que realizar una minuciosa investigación, por ejemplo, si se tiene una ruta sintética de 3 pasos y la impureza se observó en la etapa 1 es mandatorio saber que pasó en la etapa 1 y que dio origen a este subproducto.

El siguiente ejemplo clarificara lo antes expuesto. Durante la fabricación de un intermedio, una impureza es detectada en el tercer paso de la síntesis. Esto quiere decir que se debe buscar un compuesto que normalmente no se encuentre en el perfil de impurezas y que pueda haber reaccionado en la etapa sintética previa. Habitualmente esta acción se hace de la etapa sintética detectada hacia atrás. Por ejemplo, en el esquema 2 se muestra el perfil de impurezas normal para tres pasos de síntesis. En la figura **a** hay un compuesto diferente (impureza desconocida X-3). En la figura **b** se puede ver que también está presente (impureza desconocida X-2), nótese que en el perfil normal no se detecta este subproducto. Por lo que es necesario seguir al paso 1. En la figura **c** también está presente. Sólo queda pendiente revisar las materias primas. En la figura **d** se observa que el compuesto problema se encuentra en una materia prima. Es decir,

se observa un compuesto adicional a los perfiles de impurezas normales. En general, la impureza esta desde el inicio de la síntesis y evoluciona conforme se avanza en la misma. En este caso concreto, con objeto de descartar la hipótesis de que las impurezas sean materias primas remanentes se inyectan patrones de estas en una muestra que tenga un perfil normal. Como conclusión de este estudio se tiene lo siguiente:

- La impureza tiene grupos funcionales susceptibles de reaccionar con los reactivos de las etapas sintéticas.
- La impureza viene de una materia prima

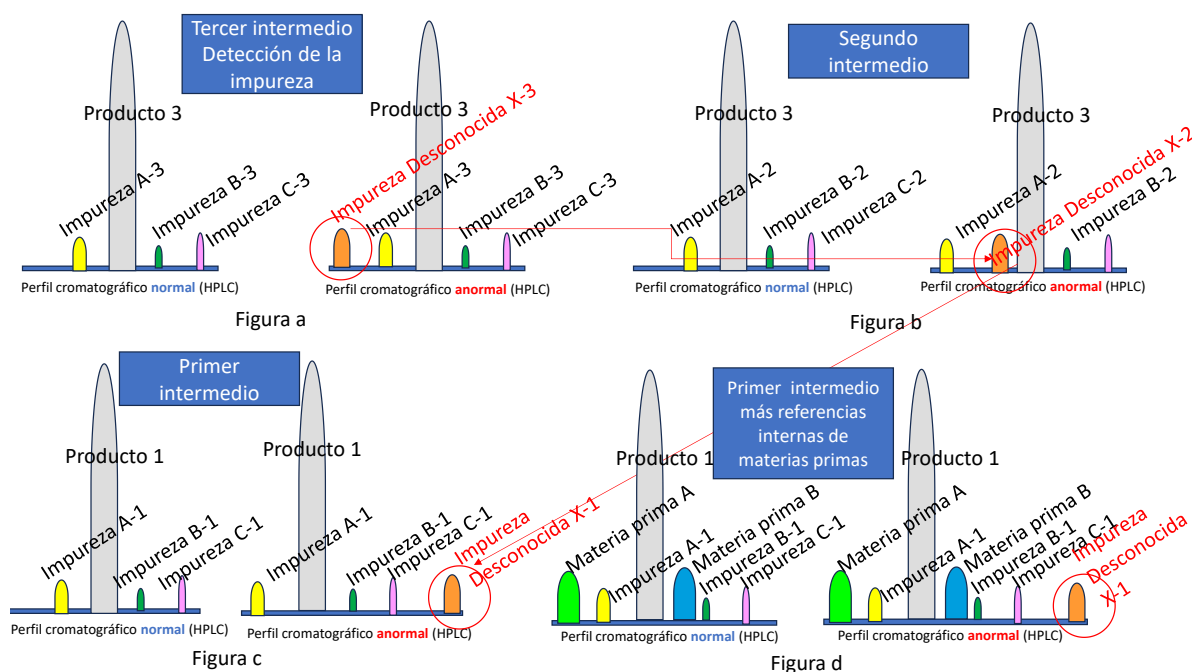


Figura 6. Ejemplo de trazabilidad de las impurezas (Origen)

Otra razón de gran peso es que la trazabilidad acotará la investigación a una etapa en concreto lo que permitirá optimizar los recursos destinados a esta tarea.

Este comparativo se puede efectuar con otras metodologías analíticas como resonancia magnética nuclear, infrarrojo o espectrometría de masas, etc. La cromatografía líquida de alta resolución suele ser el análisis más común en la industria farmoquímica/farmacéutica en cuanto a cuantificación de impurezas se refiere.

3.3. Aislamiento

Una vez establecida la etapa de origen de la impureza, en ocasiones es necesario aislarla para poder elucidar la estructura, corregir el error y continuar con la fabricación. De hecho, una metodología ampliamente usada es la del aislamiento fuera de línea. Esto consiste en aislar la impureza ya sea de la muestra de reacción, de las aguas madres, del producto aislado o por muestras expuestas a condiciones de degradación. Una vez aislada se utilizan métodos espectroscópicos para elucidar la impureza [20].

Diferentes aproximaciones se pueden utilizar. Las principales son: purificación en columna cromatográfica, separación en placas de separación por cromatografía, extracción-líquido / sólido, extracción líquido-líquido [21], cromatografía líquida y de gases. Alternativamente, nuevas metodologías han sido desarrolladas con el objetivo de separar un compuesto de una mezcla compleja (métodos hifenados). En este contexto, Rahman *et al.* reportaron la

siguiente metodología en un árbol de decisiones. Primero separan de manera preliminar la impureza. Se compara con muestras de proceso. Puede ser una impureza de proceso la cual ya está identificada. Por otro lado, si no concuerda, se debe emplear una técnica de separación más sofisticada aunado a una técnica hifenada. Si los datos son suficientes se procede a elucidar la estructura. Si no se puede, se debe utilizar adicionalmente resonancia magnética nuclear acoplada a cromatografía líquida de alta resolución [22]. Esto generará una propuesta de estructura la cual deberá ser corroborada por síntesis en laboratorio.

El objetivo primordial de esta etapa se centra en obtener muestras reales de la impureza para poder hacer la caracterización espectroscópica y proponer una estructura química. Esta estructura deberá estar sustentada por una hipótesis de la generación mediante la investigación realizada en paralelo.

3.4. Análisis

Una vez aislada la impureza es necesario ejecutar una serie de análisis con el objetivo de determinar todas las características fisicoquímicas y espectroscópicas para brindar la mayor información posible y tratar de determinar la estructura de la impureza. En los principios activos e intermedios fabricados bajo un sistema de calidad bien establecido, las materias primas, así como los intermedios conocidos están analizados, su estructura es conocida y servirán de referencia para poder saber qué tipo de impureza está contaminando el producto. En la tabla 1 se menciona el tipo de análisis y la información que brinda cada tipo de análisis acerca de la molécula. Por ejemplo, que grupos funcionales posee (infrarrojo), en qué estado sólido se encuentra, es decir como compuesto libre, como una sal orgánica, o es un solvato o un polimorfo (Rayos X de polvo). Que conectividad hay entre los grupos funcionales o el número de carbonos que tiene la estructura (resonancia magnética nuclear) o la masa molecular de la estructura (espectroscopia de masas). El valor del Karl Fisher indica cuánta agua hay presente en la estructura. La valoración indica la cantidad de producto se tiene en el intermedio o principio activo esto basándose en el tipo de valoración que se tenga (ácido-base, redox, etc.). La pérdida por secado muestra cuanto disolvente residual se tiene en el producto. Y las impurezas elementales brindan la información asociada a compuestos metálicos (por ejemplo, contenido de paladio, rodio, metales pesados, etc.) [23]. El resultado conjunto brinda los datos analíticos necesarios para determinar la estructura.

Tabla 1. Tipos de análisis e información que brindan

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Cantidad de la impureza presente en un lote de producto
Espectroscopía de masas (EM)	Peso molecular de la impureza. Patrones de fragmentación
Difracción Rayos X (RX)	Determinación de la forma sólida de la impureza (solvato, hidrato, polimorfo, sal orgánica farmacéutica, etc.).
Espectroscopía infrarroja (IR)	Grupos funcionales presentes en la molécula problema
Resonancia magnética nuclear (RMN)	Conectividad de los grupos funcionales de las moléculas por RMN H^1 y RMN C^{13}
Cromatografía de gases (CG)	Determinación de compuestos volátiles y disolventes residuales
Valoración (val)	Determinación de la cantidad de base libre disponible
Karl Fisher (KF)	Determinación del contenido de agua
Perdida por secado (LOD)	Determinación de disolventes residuales
Impurezas elementales (EI)	Tipo y cantidad de metales en el producto

3.5. Desarrollo de metodologías analíticas

La necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que cubran los requerimientos para elucidar matrices cada vez más complicadas ha derivado en la innovación tecnológica, tal es el caso de las técnicas hífenadas que han brindado la oportunidad de purificar e identificar compuestos provenientes de matrices complejas. Las técnicas hífenadas son la combinación de una técnica de separación unida a una técnica de detección en el mismo equipo. Estas técnicas sirven para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas con un mínimo de preparación [24]. Como se mencionó previamente la hífenación usa una técnica de separación usualmente cromatografía líquida (HPLC) o de gases (CG), electroforesis capilar (EC) unida a una técnica de detección tales como: arreglo de fotodiodos (PDA), resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) espectroscopia de masas (MS). Esto ha generado nuevas metodologías LC-PAD, o LC-FTIR, GC o LC-NMR, GC o LC-MS. Incluso hay combinación de tres técnicas analíticas. Adicionalmente, otras metodologías se han reportado recientemente [25], tales es el caso de: UHPL que es cromatografía líquida de ultra alto rendimiento, HPLC-MS-NMR: Cromatografía líquida de alta resolución-resonancia magnética nuclear y HPLC-MS-MS-NMR: Cromatografía de alta resolución acoplada a Espectroscopia de masas y resonancia magnética nuclear. En cuanto a metodologías se refiere, Dhaggar *et al.* reportan en su compilación referencias para aproximadamente 65 métodos para determinación de impurezas en sustancias activas (33 para HPLC, 5 para cromatografía de gases, 5 por ultravioleta, 9 por electroforesis capilar y 13 por métodos hífenados) [26].

Con la adecuada metodología se puede determinar la estructura de un compuesto químico, por lo que el siguiente párrafo se enfocara en la síntesis y elucidación.

4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y SÍNTESIS

Los datos obtenidos en la etapa de análisis se deben revisar para discernir qué tipo de impureza es la causante de la problemática. Es como un rompecabezas que se debe ir complementado poco a poco. Es importante destacar que nunca se parte de cero, ya que las materias primas (cuando se trabaja bajo las buenas prácticas de fabricación) deberían estar caracterizadas. Tomando esto como base, se puede empezar a construir el rompecabezas.

Tal como se comentó en la etapa precedente es necesario tener bien caracterizadas las materias primas y se debe familiarizar con los espectros, reportes, gráficas, etc., obtenidas de la etapa de análisis. Esto con la finalidad de poder determinar cambios que en ocasiones son casi imperceptibles en la analítica realizada. Una vez elucidada la estructura es necesario realizar la síntesis de la molécula para confirmar definitivamente la estructura de la impureza. En muchas ocasiones la síntesis de las impurezas se puede llevar a cabo utilizando el mismo procedimiento de obtención de los intermedios o forma farmacéutica haciendo pequeñas variaciones, por ejemplo, estresando la molécula en cuestión por aumento de la temperatura, presión, tiempo de reacción, disminuyendo la concentración, etc. En otras ocasiones es necesario desarrollar una metodología diferente para preparar los subproductos. En todo caso es necesario corroborar que “se cazó la impureza” En los siguientes párrafos se expondrán diversos casos de estudio teóricos, se comentarán las investigaciones y medidas correctivas preventivas. Se complementará el caso con ejemplos similares descritos en la literatura, para detalles específicos se sugiere consultar la referencia correspondiente.

5. CASOS DE ESTUDIO

Los ejemplos son supuestas impurezas provenientes de los procesos de manufactura debido a excursiones, fallos operativos o de personal. En la descripción se incluirán preguntas para situar al lector, después de aislarlas y analizarlas se evalúan los datos obtenidos y se plantea un posible tipo de impureza, así como una medida de control. El ejemplo es reforzado con un caso similar descrito en la literatura.

5.1. Caso 1: Impureza proveniente de la materia prima

Durante el proceso de fabricación del tercer intermedio (¿dónde?) de una sustancia activa, se observa una impureza en un porcentaje de 0.2% (¿cuánto?) en el cromatograma de HPLC que se tomó para un control de proceso. Dicha impureza se monitorea durante todo el proceso. El contenido de esta impureza se mantiene constante durante la centrifugación (se toma muestra y se analiza). La misma proporción se mantiene durante el secado y finalmente permanece igual en el producto aislado. La impureza se aísla por cromatografía en columna de gel de sílice (¿cómo se purificó?), se analiza generando los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Datos analíticos obtenidos para el caso 1

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Tiempo de retención diferente pero muy cercano al producto
Espectroscopia de masas	Peso molecular de la impureza ligeramente diferente variabilidad de 15 unidades
Difracción Rayos X	Mínimas diferencias en la forma cristalina
Espectroscopia infrarroja	Mismos grupos funcionales
Resonancia magnética nuclear	Multiplicidad de las moléculas por RMN H¹ diferente multiplicidad (aparentemente una señal que integra para 3 H). RMN C¹³ (1 carbón adicional).
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto

La cromatografía de alta resolución separa la impureza en un tiempo de retención muy similar al del componente principal. Por otra parte, la espectroscopía infrarroja es prácticamente idéntica. Con respecto a la resonancia magnética nuclear hay diferente multiplicidad, aparentemente una señal que integra para 3 protones adicionales y la de C13 muestra un carbón adicional. El análisis que guía la investigación es la espectroscopia de masas que indica una diferencia de masas de 15 unidades lo que se corrobora con el metilo adicional detectado en la RMN.

Después del análisis, se determina que la impureza tiene un metilo adicional en la estructura, posee el mismo factor de respuesta ya que no posee grupos cromóforos adicionales. La misma forma cristalina indica que se trata de una molécula muy similar a la molécula deseada. La diferente multiplicidad en resonancia magnética nuclear indica que hay un metilo adicional. La estructura revela que se observan 15 unidades más en el espectro de masas equivalente a un CH₃ (metilo). Después de hacer el seguimiento se determina que la impureza proviene de una de las materias primas y que posee un metilo adicional. La trazabilidad indica que se observa una señal adicional en una de las materias primas.

Con esto se concluye que la impureza proviene de la materia prima, la cual no se había detectado (¿qué pasó?). Para establecer un método de control, se debe limitar esta impureza

en la especificación de las materias primas ya que al tener una estructura muy similar al producto es difícil eliminarla a través de la síntesis.

Ejemplo de este tipo de impureza se observó para el Olmesartan Medoxomilo (antihipertensivo), el derivado etilo se observó durante la síntesis del ingrediente activo se determinó que el producto provino de la contaminación por una materia prima análoga, en concreto Cloruro de **etil** magnesio en lugar de Cloruro de **metil** magnesio (figura 7) [27]. Este tipo de impurezas debe limitarse desde los materiales de partida ya que al poseer los mismos grupos funcionales no se purifica durante las etapas de fabricación (limitada capacidad de purga). Una regla empírica es que entre más similitud estructural entre la impureza y la sustancia activa es más difícil de purificar. Es decir, en este caso el proceso de purificación estándar difícilmente eliminara un etilo de un metilo.

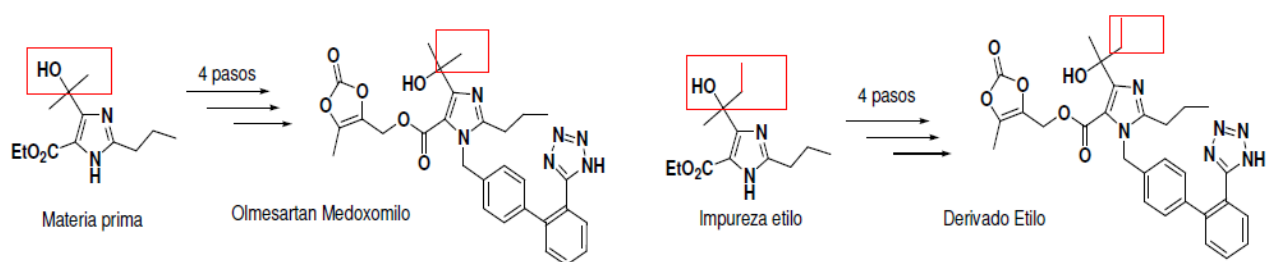


Figura 7. Ejemplo de impurezas por materiales de inicio

5.2. Caso 2: Impureza dimérica

Durante la etapa de carga de un intermedio en el cuarto paso sintético (¿dónde?) hubo una falla eléctrica, la cual se mantuvo durante dos horas. Esto hizo que el agitador del reactor se detuviera con los disolventes, reactivos y el intermedio. Al reiniciar el proceso se observó que el producto solidificó en el interior del reactor, así que tuvo un comportamiento anómalo. Es decir, no se disolvió rápidamente si no que tardó un par de horas adicionales para disolverse (¿qué pasó?). Esto hizo que al inicio las concentraciones de reactantes y reactivos fueran altas, lo que favoreció la generación de una impureza la cual se encontró en un contenido de 0.65% (¿cuánto?). Una vez aislado el intermedio, el subproducto se separó mediante concentración de las aguas madres y posterior purificación en placa preparativa (¿cómo se purificó?) obteniéndose los siguientes resultados: (Tabla 3).

Tabla 3. Datos analíticos obtenidos para el caso 2.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Tiempo de retención diferente indicando un compuesto apolar. Tiempo de retención mayor al compuesto principal y que eluye casi al final en un sistema de fase inversa.
Espectroscopia de masas	Peso molecular de la impureza aproximadamente del doble del producto
Difracción Rayos X	Diferencias mínimas en la forma cristalina
Espectroscopia infrarroja	Los grupos funcionales se observan de forma más intensa en la misma concentración
Resonancia magnética nuclear	Multiplicidad de las moléculas por RMN H^1 se observa la misma multiplicidad, pero diferente integración (las señales integran para el doble de H). RMN C^{13} : Se observan el doble de carbonos
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto
Factor de respuesta	Doble del producto
Karl Fischer	Igual que el producto

El tiempo de retención de la impureza indica un compuesto apolar, la elución en un sistema de fase inversa casi al final del análisis indica que el producto como ya se sabe tiene un peso molecular alto. El peso molecular es muy importante ya que en este caso es del doble del producto este dato se obtuvo por cromatografía de masas, la propuesta de este tipo de impureza es corroborada por la doble integración de las señales en resonancia magnética de protón y carbono 13. El factor de respuesta incrementado (doble) indica la presencia del doble de grupos funcionales. Concerniendo los rayos X de polvos, estos indican una molécula muy parecida al producto. Con base en los resultados se concluye que se trata de un dímero de la molécula final.

Teniendo en cuenta el tipo de problemática que originó el problema en la cual se mantuvieron altas concentraciones de materias primas se propone que la impureza es un dímero. Los dímeros, trímeros, etc., son de las impurezas más comunes en la síntesis de sustancia activas y habitualmente aparecen cuando las concentraciones de reactivos se incrementan.

Un ejemplo reportado en la literatura asociado a un intermedio en la síntesis del Elitriptano (analgésico) muestra la impureza dimérica que tiene aproximadamente el doble del peso molecular del intermedio [28]. Las impurezas diméricas, triméricas, etc., se obtienen debido a la presencia de grupos funcionales múltiples. Esta característica asociada a altas concentraciones durante la etapa de reacción debido a que se detuvo la agitación durante el proceso derivó en la generación de una impureza. Se pueden establecer medidas de control por ejemplo aumentando la dilución de la reacción, adicionando los reactivos lentamente o haciendo menos drásticas las condiciones de reacción. En el caso concreto de una falla eléctrica, la potencial medida para controlarla es incluyendo una planta de emergencia que pueda mitigar este problema (medidas de control).

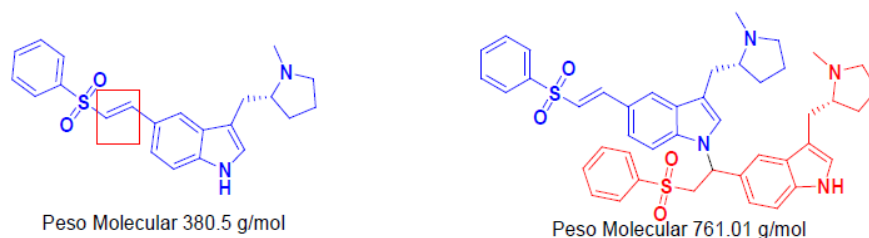


Figura 8. Ejemplo de impureza dimérica

5.3. Caso 3: Dihidrato

Durante el secado de un clorhidrato de principio activo de una ruta sintética de 5 pasos (¿dónde?), se observó un comportamiento anómalo con la eliminación de disolvente residual en el producto. Habitualmente el producto se seca en 12 horas, sin embargo, después de 26 h se observa un contenido de agua más alto del habitual y el mismo se mantuvo invariable durante 24 horas adicionales. Datos importantes de la síntesis son: el disolvente de aislamiento es isopropanol, ya que el producto es un clorhidrato soluble en agua y el aislamiento es mediante el uso de cloruro de hidrógeno en isopropanol. Otro dato relevante es que el intermedio a fabricar es un monohidrato. Por lo tanto, es un clorhidrato con una molécula de agua integrada a la estructura.

En vista de los resultados se decide enfriar el producto descargarlo y analizarlo. Se observan los siguientes datos analíticos (Tabla 4).

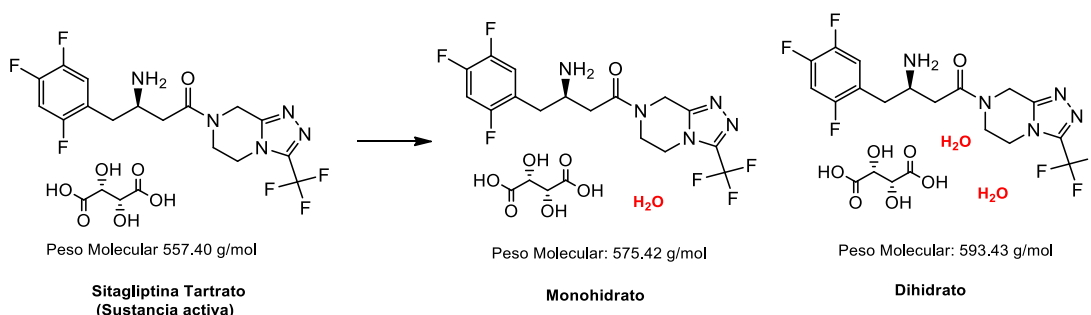
Tabla 4. Datos analíticos obtenidos para el caso 3.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Mismo tiempo de retención. La impureza no se detecta por CLAR
Espectroscopia de masas	Misma masa molecular
Difracción Rayos X	Diferencias en la forma cristalina
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Misma multiplicidad que el producto
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto
Factor de respuesta	Mismo que el producto
Karl Fischer	Se observa el equivalente a dos moléculas de agua en KF. Aun después de secar exhaustivamente la muestra

El primer análisis que se ejecuta es el Karl Fisher, el porcentaje de agua que se obtiene es el equivalente a dos moléculas de agua, en este caso la impureza es agua por lo tanto no es necesario aislar la impureza. En cuanto a las cromatografías, ni la CLAR, la RMN o la CG logran detectar diferencias en el producto. El patrón diferente en la forma cristalina indica que no es la misma sustancia, esto se corrobora con las dos moléculas de agua detectadas por la metodología de Karl Fischer. Y se ratifica por la diferente funcionalidad del espectro infrarrojo. La pérdida por secado aun en condiciones exhaustivas indica que es un compuesto estable. Básicamente, la impureza es un dihidrato del producto de referencia.

Durante la investigación se detectó que el operario por error cargó el doble de agua durante la cristalización. Tenía que cargar 24 litros de agua al proceso, pero la válvula del agua se rompió y en total cargó 48 litros. En esta etapa el agua es un reactivo limitante y el principio activo tiende a hacer polihidratos. Como medida preventiva se pueden establecer condiciones anhidras en los equipos de fabricación o en su defecto si la molécula deseada fuera un monohidrato, se debe controlar de manera estequiométrica la cantidad de agua que se introduce en el último paso de la síntesis, se podría pesar exactamente la cantidad de agua a cargar. Adicionalmente, este paso de síntesis debe ser verificado con una doble revisión en el documento de fabricación (batch record).

Para ejemplificar este caso, recientemente se reportaron diversos hidratos y polimorfos para la Sitagliptina Tartrato (antihiper glucemiante). En este trabajo expresamente se prepararon varios hidratos utilizando la respectiva sal de Tartrato en combinación con diferentes disolventes incluyendo agua. La estructura se determinó mediante varias técnicas (calorimetría por escaneo diferencial, termogravimetría, rayos x de polvos y absorción dinámica de vapor). También se estudiaron las propiedades de hidratación y deshidratación de la molécula, en este ejemplo expresamente se buscó la formación de hidratos no obstante esta metodología también sirve de referencia en el caso presentado [29].

**Figura 9.** Ejemplo de impureza generada por el agua

5.4. Caso 4: Polimorfismo

Durante la cristalización final de una sustancia activa (¿dónde?), específicamente en la rampa de enfriamiento de 78 a 0 °C se observó un incremento de la temperatura de cristalización, en lugar de precipitar entre 50 °C a 60 °C en alrededor de 10 minutos. El producto precipitó abruptamente a los 63 °C. Esta observación infiere directamente que se pudo obtener otra forma sólida diferente de la esperada. El producto fue aislado por centrifugación y posterior secado. Después de analizarlo se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 5):

Tabla 5. Datos analíticos obtenidos para el caso 4.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Mismo tiempo de retención. La impureza no se detecta por CLAR
Espectroscopia de masas	Misma masa molecular
Difracción Rayos X	Diferente
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Mismo desplazamiento y multiplicidad
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales orgánicos igual al producto
Factor de respuesta	Mismo que el producto
Karl Fischer	Mismo que el producto
Punto de fusión	Diferente comportamiento por DSC

En cromatografía líquida de alta resolución no se observan diferencias ya que la impureza tiene el mismo tiempo de retención. Concerniente al ion molecular se observa la misma masa. La difracción de rayos X indica que se obtiene un nuevo patrón y la evaluación concluye que todo el producto tiene esta nueva forma sólida (¿cuánto?). Esto se confirma con la espectroscopia de infrarrojo en la cual se obtiene un cromatograma diferente.

El DSC exhibe diferentes comportamientos térmicos esto indica que es un nuevo polimorfo. La investigación arrojó que durante el calentamiento el operario incluyó la consigna para utilizar todo el calor disponible (120 °C) esto hizo que el producto estuviera sometido a una alta temperatura por aproximadamente 90 minutos, esta alta temperatura generó evaporación de disolvente y a su vez puntos de crecimiento de cristales con otra forma sólida. Cuando se realizó la rampa de enfriamiento el producto cristalizó de una forma diferente. La medida de control fue establecer una consigna de calentamiento menos drástica, esto se modificó en el documento de fabricación incluyendo una doble verificación.

El caso reportado en la literatura es el Ritonavir (antiviral) [30]. El Ritonavir se descubrió en 1992, posteriormente en 1995 se hizo la aplicación ante la FDA. La fabricación a nivel comercial empezó en 1996. Este producto fue comercializado como una cápsula semisólida. En 1998 se observó que varios lotes de la forma farmacéutica fallaron la prueba de disolución ya que la sustancia activa se precipitó en ellas. Para determinar las diferentes formas sólidas se hicieron pruebas de cristalización. La forma I que era la conocida se disolvió en etanol a 40 °C, la disolución se filtró en caliente a un recipiente conteniendo cristales de la forma II aisladas de las capsulas semisólidas. Al contacto de la solución saturada con los cristales de la forma II se observó precipitación inmediata. Esta solución se enfrió a 25 °C y mantuvo toda la noche. Los cristales formados después de filtrarlos presentaron la forma II. A las aguas madres sin precipitar se les evaporó el disolvente y presentaron la forma I.

Una alternativa para el control de las impurezas polimórficas en las sustancias activas es utilizar una siembra. Una siembra es una porción de sustancia activa que contiene la información necesaria para obtener el polimorfo deseado. Un ejemplo acerca del uso de una siembra en el Palbociclib (anticancerígeno) se reportó por Chekal *et al.* [31].

5.5. Caso 5: Formación de sal orgánica o aducto de Michael

En la etapa de análisis de una forma farmacéutica en la cual se utilizó almidón pregelatinizado como excipiente y una sal orgánica de un principio activo se observó la formación de una impureza en un porcentaje de 0,4% (¿cuánto?). En este caso la impureza fue aislada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas. La impureza fue caracterizada brindando los siguientes datos (Tabla 6).

Tabla 6. Datos analíticos obtenidos para el caso 5.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Diferente tiempo de retención.
Espectroscopia de masas	Diferente masa molecular. Masa + peso molecular del contraíón
Difracción Rayos X	Diferente
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Pequeñas diferencias con el producto que coinciden con el contraíón
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto
Factor de respuesta	Mismo que el producto
Karl Fischer	Mismo que el producto
Perdida por secado	Misma que el producto de referencia.

La investigación indicó que la impureza se formó en la etapa de manufactura de la forma farmacéutica (¿dónde?). Por lo tanto, se puede inferir un par de situaciones:

- la sustancia activa reaccionó con un excipiente
- alguna sustancia contenida en el excipiente propició la formación de la impureza

En lo que respecta a los datos analíticos la cromatografía líquida indicó que se trata de otra molécula. El peso molecular diferente es un indicativo de que la impureza podría provenir de la formación de una reacción. En este caso se tiene la sal orgánica de un principio activo el cual se divide en: principio activo y contraíón. Adicionalmente se tiene el excipiente que es almidón pregelatinizado. Curiosamente el ion molecular es la sumatoria del peso molecular de la sustancia activa más el peso del contraíón. Es necesario tener en mente que la masa molecular de la sustancia activa es por una parte la de la base libre y en segundo lugar el del contraíón. Por lo tanto, se infiere que de alguna manera la sustancia activa y el contraíón reaccionaron para generar un subproducto. El espectro de infrarrojo corrobora una estructura diferente. En la RMN de protón se observan protones que corresponden al producto de adición del contraíón en la sustancia activa (adición de Michael). El espectro de RX también corrobora que la impureza no corresponde a la sustancia activa. Los otros análisis permanecen sin cambios respecto al producto de referencia.

Este caso corresponde a la obtención de una impureza presente durante la preparación de una forma farmacéutica de Maleato de Siproxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina). En la fabricación se utilizó almidón pregelatinizado y mantenido a 25 / 40 °C. Después de analizar el caso se determinó que la presencia de esta impureza fue debido al agua presente en el almidón. El agua debió disolver restos básicos que cambiaron localmente el pH

lo suficiente para liberar la base libre y que la amina pudiera atacar en una reacción tipo Michael al ácido Málico (aceptor de Michael) [32]. El método para poder mitigar esta problemática es utilizar un almidón muy bajo en contenido de agua, esto podría establecerse en la especificación del almidón.

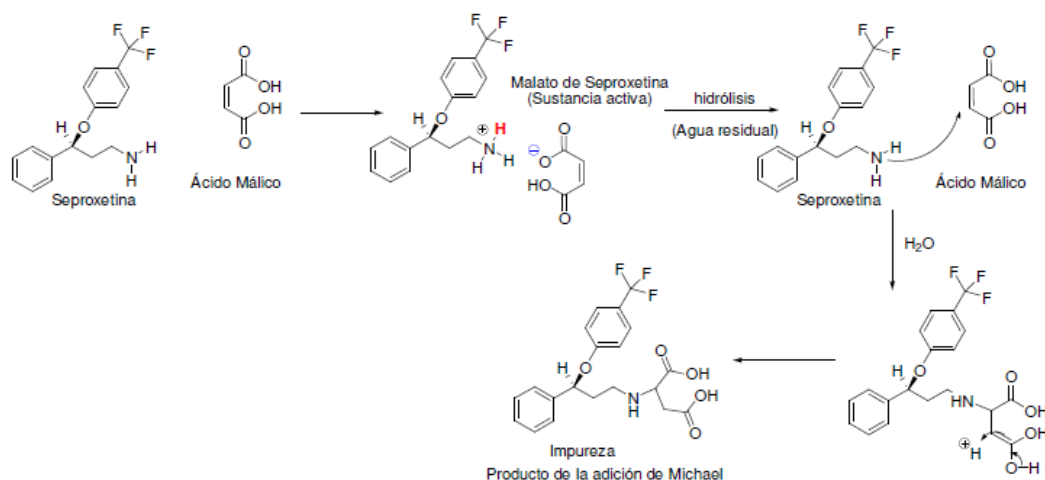


Figura 10. Impureza por reacción con el contraión

5.6. Caso 6: Impureza por reordenamiento de enlaces

El siguiente caso es una impureza obtenida a partir de un reordenamiento de enlaces el caso es el siguiente. Durante un proceso de esterilización térmica para la preparación de la forma farmacéutica se observó la formación de una impureza en un lote de sustancia activa. En la esterilización se puso en contacto el principio activo y agua libre de pirógenos. Durante la operación la impureza precipitó espontáneamente después del proceso y fue aislada por filtración. Los análisis obtenidos fueron los siguientes (Tabla 7):

Tabla 7. Datos analíticos obtenidos para el caso 6.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Diferente tiempo de retención.
Espectroscopia de masas	Diferente masa molecular.
Difracción Rayos X	Diferente patrón de RX
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Diferente multiplicidad en RMN de H y C13. El carbono del ácido carboxílico cambió de desplazamiento a uno similar a una cetona.
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto
Factor de respuesta	Mismo que el producto
pH (disolución)	Pasó de 7.94 a 10.89

Los análisis indican que se trata de un compuesto diferente a la sustancia activa. Ya que tanto la cromatografía líquida, la espectroscopia de masas, los rayos x de polvo, el infrarrojo y la resonancia magnética nuclear son diferentes a la molécula original. Los datos cruciales para tratar de conocer la estructura son:

- El cambio sucedió en condiciones térmicas (123 °C)
- Se observó generación de Hidróxido de sodio lo que hizo cambiar el pH de la disolución.

- La impureza precipitó espontáneamente
- La impureza generada tiene una estructura y propiedades espectroscópicas totalmente diferentes a la sustancia de partida (ingrediente activo).

Las condiciones térmicas y las diferencias en las propiedades espectroscópicas sugieren una estructura nueva, por lo que podría tratarse de un rearrreglo estructural. En este contexto, existen varios programas disponibles para hacer modelos de las posibles estructuras que se pueden correlacionar con los datos obtenidos del análisis. Esta estructura resultó ser una molécula proveniente de un rearrreglo intramolecular.

El caso descrito en la literatura corresponde al Diclofenaco sódico (antiinflamatorio no esteroideo). En pruebas de esterilización para una formulación de Diclofenaco Sódico se observó formación de opalescencia. Las condiciones extremas (123 ± 2 °C) jugaron un rol muy importante en la formación de la impureza. También se observó aumento del pH del medio pasando de 7.9 / 8.2 a 10.9 lo que indicó la generación de Hidróxido de sodio como subproducto. Se observó un ataque de la función amina sobre el grupo carbonilo de la molécula. El intermediario sufre una eliminación de hidróxido de sodio que dio origen a una Indolina. Los autores decidieron cambiar de metodología de esterilización proponiendo una filtración aséptica [33]. Un dato por retener de este caso es que cuando se utilizan condiciones drásticas es posible la formación de rearrreglos inter o intramoleculares. De hecho, algunos compuestos químicos sufren rearrreglos en su estructura si los grupos funcionales se ordenan adecuadamente. Probablemente este es uno de los casos más difíciles de elucidar no obstante algunos patrones de reordenamiento ya se han descrito previamente en la literatura [34].

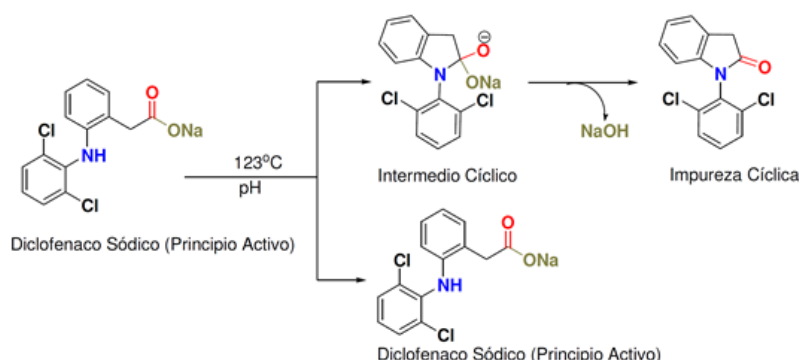


Figura 11. Impureza obtenida por el método de fabricación

5.7. Caso 7: Impureza metálica

Durante la síntesis del segundo intermedio de una sustancia activa en la cual se hizo una sustitución nucleófila se observó degradación, obteniéndose rendimientos muy bajos y un perfil de impurezas con varios subproductos adicionales, con un total de 5% de impurezas dividido en varias estructuras. Inicialmente se revisaron las condiciones de reacción, las cuales no arrojaron ninguna desviación del proceso. Cabe destacar que el intermedio precedente fue generado mediante una reacción de acoplamiento con Paladio. Puesto que no se encontró un problema determinado, se procedió a la fabricación de otro lote el cual sufrió el mismo destino. En vista de estos datos, se decidió hacer una repetición analítica y se hizo una evaluación exhaustiva de los datos (Tabla 8). Durante el análisis no se detectó anomalía alguna, por lo tanto y buscado una explicación plausible se determinó el contenido de paladio en el intermedio. Este parámetro se determina en el principio activo por tal motivo no se encuentra en la especificación del intermedio. El resultado fue de 800 PPM de este metal. Algunos lotes que se

tenían en la muestrero de la muestra fueron analizados con el objeto de verificar si esto era un valor cotidiano. En esta tesis se analizaron los últimos 7 lotes de la campaña y el resultado fue “no detecta”. Por lo tanto, la causa probable de esta problemática fue el contenido de paladio. Con respecto al intermedio este fue tratado con un secuestrador de paladio y enseguida cristalizado. El intermedio se utilizó en la síntesis habitual dando buenos resultados. Durante la investigación se detectó que uno de los papeles del filtro lenticular utilizado, tenía un pequeño poro por el cual pudo haber pasado un poco de metal residual. La medida de contención fue poner un filtro de pulido al final de la línea de filtración, esta acción evitará que haya paladio que pase a través del sistema de filtración. Por otra parte, el Paladio es un metal pesado que se debe controlar en los intermedios y en las sustancias activas, consecuentemente otra medida de control es realizar el análisis en el intermedio que tuvo el problema.

Tabla 8. Datos analíticos obtenidos para el caso 7.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Mismo tiempo de retención.
Espectroscopia de masas	Misma masa molecular.
Difracción Rayos X	Mismo patrón de RX
Espectroscopia infrarroja	Mismo espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Misma multiplicidad en RMN de H y C13.
Cromatografía de gases	Perfil de disolventes residuales igual al producto
Factor de respuesta	Mismo que el producto
Karl Fischer	Mismo que el producto
Contenido de metales (ICP)	Alto contenido de Paladio

Caso reportado en la literatura. Recientemente se reportó el uso de secuestradores de Paladio para el Ceftolozano (antibiótico). La sal intermediaria contenía aproximadamente 50 PPM de Paladio, mientras que la concentración permitida en el principio activo final es de <1 PPM. Claramente, el objetivo fue reducir al mínimo la concentración de este compuesto. Durante el estudio se probaron diversos tipos de secuestradores. En la optimización se usaron diversos carbones activados, polímeros sobre soporte sólido, derivados de Tioureas y finalmente derivados de Tiocarbonatos. Precisamente estos últimos demostraron ser muy efectivos en cuanto a la eliminación selectiva de Paladio. Igualmente se demostró la estabilidad en medio ácido (necesaria para sintetizar la sal final) y ser de muy bajo costo. Con esta metodología se obtuvieron niveles de paladio inferiores a 1 ppm [35]. Como medida preventiva, cuando se realicen este tipo de reacciones en la medida de lo posible se debe incluir la determinación de paladio en la especificación del intermedio con objeto de evitar contratiempos en la etapa final. En los ingredientes farmacéuticos las impurezas metálicas están estrechamente limitadas debido a que muchos de estos residuos metálicos son muy tóxicos. De hecho, la ICH3D clasifica los metales en 4 grupos y establece límites para estos compuestos. De estos metales el Paladio se ha destacado por la versatilidad de sus aplicaciones en la química de procesos. No obstante, la correcta eliminación de este es de crucial importancia. En este contexto varias metodologías de secuestradores de Paladio se han utilizado para la correcta eliminación de este metal. Dentro de las metodologías utilizadas se ha descrito: el uso de secuestradores especializados de paladio portando grupos Trimercaptotriazina, Etilendiamina, también carbón activo, otros tipos de soportes con grupos protectores especializados desarrollados por casas comerciales, N-acetilcisteína, tiourea, fosfinas, cisteína [36].

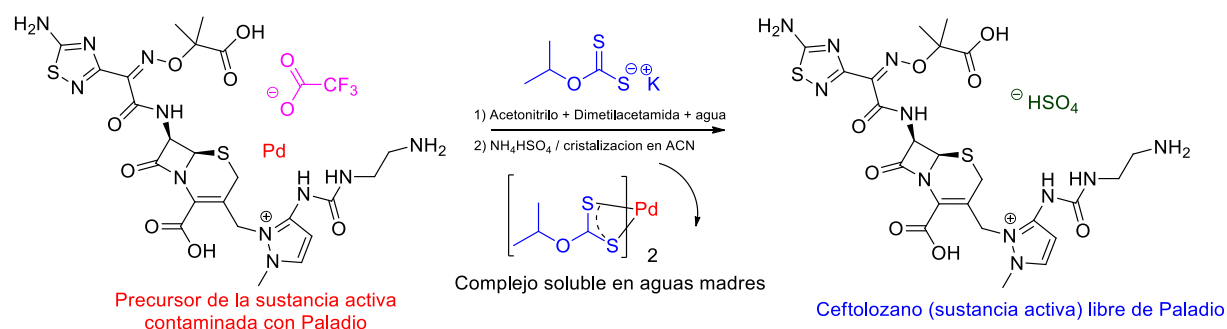


Figura 12. Impurezas residuales de metales pesados

5.8. Caso 8: Reacción del principio activo con el disolvente

Durante la cristalización final de una sustancia activa (¿dónde?), se llevó a reflujo la cristalización para lograr completa disolución. Durante el calentamiento el sistema de control se tuvo un fallo y mantuvo la temperatura a 32 °C durante 8 horas adicionales. Posteriormente el producto se cristalizó, se aisló mediante centrifugación y se secó. Una vez analizada se encontró una impureza en 0,8% (¿cuánto?). En ocasiones es en extremo difícil de determinar la estructura de los subproductos sobre todo si la estructura resultante es casi improbable de formarse. En este ejemplo los datos observados tras el análisis están reportados en la tabla siguiente.

Tabla 9. Datos analíticos obtenidos para el caso 8.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Diferente tiempo de retención.
Espectroscopia de masas	Diferencia de masa molecular de 84.93
Difracción Rayos X	Diferente
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Diferente multiplicidad en RMN de H y C13. Se observa un metileno afectado por uno o dos heteroátomos
Cromatografía de gases	NA
Factor de respuesta	Mismo que el producto
Karl Fischer	Mismo que el producto
Perdida por secado	NA

Una vez compilados los datos se infiere que la molécula es diferente ya que la cromatografía líquida, el peso molecular, la difracción de RX y el infrarrojo es diferente. Esto se confirma con la diferente multiplicidad observada por resonancia de protón (H) y carbono 13 (C¹³). Por lo tanto, la impureza es una molécula diferente del producto principal. El proceso en el que se obtuvo la impureza fue una cristalización final. Siendo la molécula final únicamente cargada en el reactor. Las condiciones de reacción fueron 32 °C durante 2 horas y sin embargo este calentamiento se mantuvo por mucho más tiempo. Durante la investigación se detectó que las válvulas del reactor fallaron y el calentamiento se mantuvo por un total de 8 horas. Lo que lleva a suponer que el producto pudo haberse degradado o sufrido una reacción. Otra alternativa es que el producto reaccionó con el disolvente, aunque es muy poco probable es posible que suceda. Durante la investigación se determinó que un actuador de una de las válvulas estaba dañado, el actuador se cambió. También se determinó que estas válvulas no estaban en el programa de mantenimiento preventivo motivo por el cual se incluyeron, esta acción mitiga la reincidencia.

En cuanto al caso práctico, durante la revisión de las impurezas de la Olanzapina (antipsicótico) reportada por Thatipalli *et al.* [37] se observó la impureza de interacción con el cloruro de metileno. La impureza se sintetizó para comprobar la estructura generando el compuesto en el cual se incorporó una molécula de cloruro de metileno (Figura 12). La lección aprendida que brinda este ejemplo es no dar por sentado nada, ya que hasta el disolvente bajo las condiciones apropiadas puede reaccionar con el principio activo.

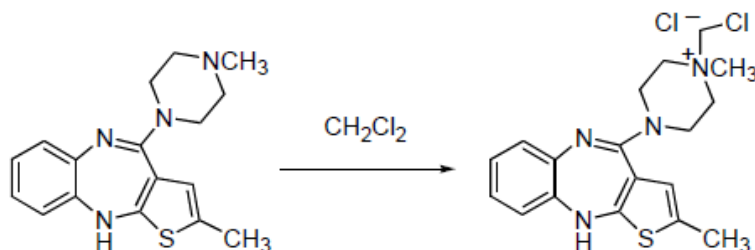


Figura 13. Impureza por reacción con el disolvente

5.9. Caso 9: Reacción del principio activo con el excipiente

Durante el desarrollo de una forma farmacéutica se utilizó óxido de magnesio a 55 °C para preparar tabletas (¿dónde?). Una vez las tabletas fueron fabricadas se determinó el contenido de la sustancia activa y se observó la formación de una impureza apolar de 2,3% con respecto a la sustancia activa de referencia. Tras aislar la impureza por cromatografía en columna en gel de sílice se obtuvieron los siguientes datos analíticos:

Tabla 10. Datos analíticos obtenidos para el caso 9.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Diferente tiempo de retención
Espectroscopia de masas	Diferencia de 2 veces la masa molecular más 24 unidades
Difracción Rayos X	Diferente
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Diferente multiplicidad en RMN de H y C ¹³ . Se observa integración para dos moléculas
Cromatografía de gases	No determinado
Factor de respuesta	Mitad del producto de referencia
Karl Fischer	Anhidro
Espectrometría de absorción atómica	Determinación de un átomo de magnesio

Los datos indican que la impureza tiene un tiempo de retención diferente al compuesto problema en cromatografía de líquidos. La espectroscopia de masas indica una masa de aproximadamente el doble de la molécula de referencia. La difracción de RX, indica que es una molécula totalmente diferente ya que las señales son completamente diferentes. Se tiene un espectro de infrarrojo diferente. Y la multiplicidad de RMN integra para dos moléculas de la sustancia activa. En la espectrometría de absorción atómica se observa un átomo de magnesio.

El dato crucial es el generado por la espectroscopia de masas que es dos veces la masa molecular más 24 unidades. Esto quiere decir que probablemente se obtuvo un dímero con “algo adicional”. El factor de respuesta fue de aproximadamente 0,5% aun así la impureza

quedaría en 1,15% y sigue siendo un problema. El caso reportado en la literatura es el siguiente:

En un estudio de compatibilidad del Ibuprofeno con el óxido de magnesio, se observó una impureza la cual se analizó y se aisló. Durante los estudios entre la sustancia activa y el excipiente se observó una reacción sólido-sólido en mezclas 1:1 y 2:1 cuando se sometieron a 55 °C. La sal obtenida fue determinada mediante estudios calorimétricos y espectroscopía de infrarrojo y comprobada mediante síntesis en laboratorio. También se corroboró que el Ibuprofeno es susceptible a la reacción con otras sales (Bicarbonato de Potasio, Carbonato de Potasio, Hidróxido de Magnesio, etc.). Un dato muy interesante es la pérdida de agua en la reacción ya que se observó un KF prácticamente anhidro. Esta es una reacción de formación de sal orgánica promovida por un excipiente, casi imposible de prever ya que se lleva a cabo en estado sólido. El dato clave es la presencia de Magnesio. El Magnesio al ser bivalente puede formar una sal con dos moléculas de Ibuprofeno. Es destacable el hecho de que la reacción de formación de sal se lleva a cabo en estado sólido promovido por la temperatura. Un método muy similar es el grindstone en el cual se ponen en contacto la sustancia activa y el contraíón y la reacción sucede en ausencia de disolvente [38]. La medida de contención en este ejemplo es cambiar el excipiente o en su defecto hacer un barrido de temperaturas buscando las condiciones para que no reaccione el principio activo. La reacción entre el Ibuprofeno y el Óxido de Magnesio se describe en la Figura 14 [39].

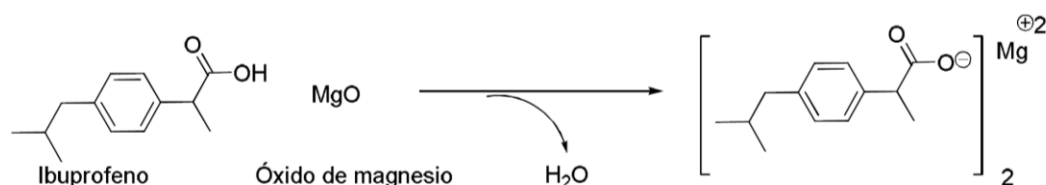


Figura 14: Impureza por reacción con el excipiente

5.10. Caso 10: Reacción del principio activo con el oxígeno catalizado por un excipiente

Durante el desarrollo de la formulación de una sal de sustancia activa se utilizó jarabe de cereza como vehículo. Durante el desarrollo se observaron la formación de varias impurezas en diversas proporciones. Un dato experimental muy importante es que las impurezas se incrementaron velozmente cuando la formulación se expuso a la luz ambiental y al oxígeno.

Tabla 11: Datos analíticos obtenidos para el caso 10.

Análisis	Información
Cromatografía líquida de alta resolución	Diferentes tiempos de retención
Espectroscopia de masas	Diferente (varias estructuras)
Difracción Rayos X	No determinado
Espectroscopia infrarroja	Diferente espectro de infrarrojo
Resonancia magnética nuclear	Diferente multiplicidad en RMN de H y C13. Se observa integración para dos moléculas
Cromatografía de gases	No determinado
Factor de respuesta	Mismo que el producto

En este caso la cromatografía líquida indicó varios compuestos totalmente diferentes, la espectroscopía de infrarrojo corroboró los resultados previos. Finalmente, la resonancia magnética nuclear también corroboró la presencia de diferentes moléculas. Este caso es fácil determinar que son moléculas diferentes, lo que no es tan sencillo es conocer las estructuras. El caso reportado en la literatura es asociado a una formulación de Losartan potásico (antihipertensivo) en el cual se utilizó jarabe de cereza como vehículo [40]. En las pruebas se observó la presencia de varias impurezas en la formulación. Se realizaron varios ensayos adicionales los cuales demostraron que la formulación estaba impactada por la luz y el oxígeno ambiental. Se demostró que el jarabe contenía un sensibilizador que promovió una reacción radicalaria con el oxígeno singulete. Este a su vez atacó la función imidazol del Losartan generando una imina que a su vez se derivó en varias degradaciones subsecuentes. Las impurezas fueron caracterizadas, aisladas y el tiempo de retención fue corroborado en cromatografía de alta resolución.

En este caso se pudieron acotar relativamente fácil las alternativas para determinar las impurezas. La sustancia activa se puso en contacto con el jarabe de cereza y crecieron las impurezas. Consecuentemente, el jarabe de cereza tenía “alguna sustancia” que degradó el Losartan. Mirando la molécula el Losartan tiene un anillo imidazol y un tetrazol. El más lábil resultó ser el imidazol. Por lo tanto, la investigación derivó en la hidrólisis del imidazol. La investigación llevó a la conclusión de que las estructuras coincidían con las moléculas de degradación de este grupo funcional. Finalmente, las impurezas observadas en este estudio se representan en la Figura 15.

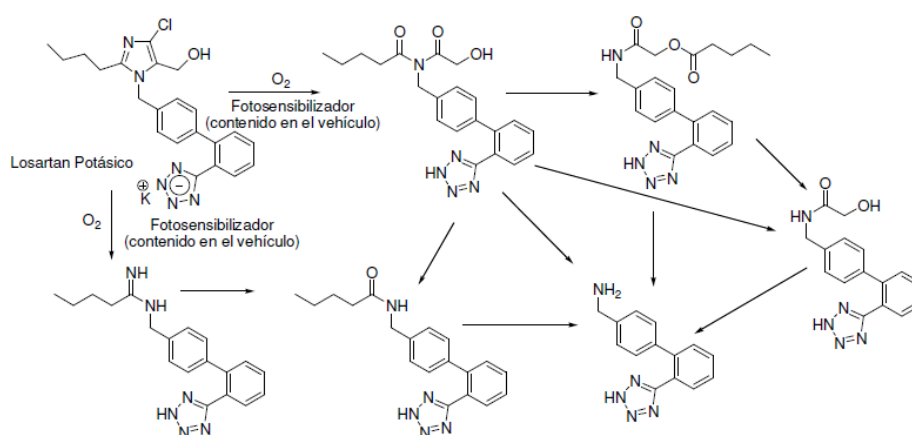


Figura 15. Impureza generada por una impureza del vehículo de la formulación

En la tabla 12 se observa una compilación de los casos comentados. La elucidación de una impureza depende de los datos espectroscópicos, pero también de la casuística de la obtención. Los casos se deben analizar muy bien para lograr tener un punto de partida. Por ejemplo, si se obtuvo una impureza en la cristalización final, podría tratarse de una reacción de la molécula final consigo misma o una posible interacción con el disolvente.

Tabla 12. Compilación de los casos presentados

	CLAR	Factor de respuesta	EM	DRX	IR	RMN	CG	Valoración	Karl Fischer	Pérdida por secado	OTRO	Tipo de impureza
1	RRT parecido	Igual que el producto	Peso molecular de la impureza ligeramente diferente variabilidad de 15 unidades	Mínimas diferencias en la forma cristalina	Mismos grupos funcionales	Multiplicidad de las moléculas por RMN H^1 diferente multiplicidad (aparentemente una señal que integra para 3 H). RMN C^{13} : 1 carbón adicional.	Misma	NA	NA	NA	NA	Proveniente de la materia prima
2	Tiempo de retención diferente indicando un compuesto apolar.	Doble del producto	Peso molecular de la impureza aproximadamente del doble del producto	Diferencias mínimas en la forma cristalina	Los grupos funcionales se observan de forma más intensa en la misma concentración	Multiplicidad de las moléculas por RMN H^1 se observa la misma multiplicidad, pero diferente integración (las señales integran para el doble de H). RMN C^{13} Se observan el doble de carbonos	Misma	NA	NA	Mismo	NA	Dimérica
3	Mismo tiempo de retención. La impureza no se detecta por CLAR	Mismo que el producto	Misma masa molecular	Diferencias en la forma cristalina	Diferente espectro de infrarrojo	Misma multiplicidad que el producto	Misma	NA	Se observa el equivalente a dos moléculas de agua en KF. Aun después de secar exhaustivamente la muestra	Misma que el producto de referencia.	Diferente DSC	Impureza dihidrato
4	Mismo tiempo de retención. La impureza no se detecta por CLAR	Mismo que el producto	Misma masa molecular	Diferente	Diferente espectro de infrarrojo	Mismo desplazamiento y multiplicidad	Misma	NA	Mismo que el producto	Misma que el producto de referencia	NA	Polimórfica
5	Mismo tiempo de retención. La impureza no se detecta por CLAR	Mismo que el producto	Diferente masa molecular. Masa + peso molecular del contraión	Diferente	Diferente	Pequeñas diferencias con el producto que coinciden con el contraión	Misma	NA	Mismo que el producto	Misma que el producto de referencia.	NA	Reacción con el contraión
6	Diferente tiempo de retención.	Diferente.	Diferente masa molecular.	Diferente espectro de infrarrojo	Diferente	Diferente multiplicidad en RMN de H y C^{13} . El carbón del ácido carboxílico cambió de desplazamiento a uno similar a una cetona.	Misma	NA	Mismo	Misma que el producto de referencia.	pH diferente	Diferente molécula.
7	Mismo	Mismo	Mismo	Mismo	Mismo	Mismo	Mismo	NA	Mismo	Mismo	Alto contenido de Paladio	Impureza elemental
8	Diferente	Mismo	Diferencia de masa molecular similar a la del disolvente usado	Diferente	Diferente	Diferente multiplicidad en RMN de H y C^{13} . Se observa un metileno afectado por uno o dos heteroátomos	Mismo	NA	Mismo	Mismo	NA	Reacción con el disolvente
9	Mismo	Doble	Diferencia de 2 veces la masa molecular más 24 unidades	Diferente	Diferente	Diferente multiplicidad en RMN de H y C^{13} . Se observa integración para dos moléculas	NA	NA	Anhidro	NA	Espectroscopia de absorción atómica. Se determina Magnesio	Formación de sal orgánica promovida por un excipiente
10	Diferente	Mismo	Diferente masa molecular.	NA	Diferente	Diferente multiplicidad en RMN de H y C^{13}	NA	NA	NA	NA	NA	Degradación vía radicalaria por una impureza del vehículo

M=misma; D=diferente; NN=no necesario

6. PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES EN LAS SUSTANCIAS ACTIVAS

Hasta este punto se han descrito diferentes casos que pueden encontrarse, sin embargo, un proceso de fabricación puede ser susceptible a muchas variables, como la, luz, temperatura, oxígeno, agua tan solo por mencionar algunos factores. Esto parecería una tarea en extremo compleja, no obstante, como ayuda en este tema Kumar *et al.* [41] en 2011 publicó una compilación acerca de las degradaciones potenciales de los principios activos. Aunque este trabajo está enfocado en interacciones con excipientes las reacciones descritas se pueden aplicar en las sustancias activas. En este reporte se incluyen los grupos funcionales la forma de degradación, los productos generados y ejemplos de sustancias activas susceptibles de padecer estas reacciones. Esta información es en extremo valiosa para cuando se tenga entre las manos un problema de elucidación estructural. Estos datos se resumen en la Tabla 13. Adicional y grandemente ilustrativo se encuentra el trabajo de Wadekar *et al.*: en la primera parte de esta revisión [42] los autores describen las potenciales fuentes de impurezas en los principios activos. Algunos ejemplos son el salmeterol, ejemplos de impurezas en materias primas, permetrezato de sodio, ciprofloxacina entre otros. En la parte II se examinan impurezas quirales, polimórficas y genotóxicas. Se mencionan varios casos incluyendo sustancias activas como la Olanzapina, Ciprofloxacina, Linezolid entre otras [43]. La parte III de estas compilaciones se enfoca a las rutas de degradación en sustancias activas e interacciones en formulaciones [44]. Por otra parte, Li compila varios mecanismos de degradación de sustancias activas incluyendo hidrolíticos, oxidativos, fotoquímicos, eliminaciones, y varios tipos de reacciones. Igualmente incluye interacciones con excipientes y degradación de compuestos biológicos [45]. Estas revisiones funcionan como guías especializadas para asesorarse cuando se necesite “cazar” una impureza.

Tabla 13. Principales productos de degradación de los grupos funcionales presentes en las sustancias activas reportado por Kumar *et al.* [41].

Grupo funcional	Reacción de degradación	Producto	Ejemplo
Estéres, Lactonas	Hidrólisis ácida	Alcohol + ácido	Aspirina, Ciclandato
Amidas, Lactamas	Hidrólisis ácida o básica	Ácido + amina	Acetaminofén, Cloranfenicol
Estéres carbámicos	Hidrólisis ácida + descarboxilación	Amina + CO ₂	Loratadina, Pipazetato
Imidas	Hidrólisis ácida o básica	Amida + ácido	Glutetimida
Cetonas y aldehídos	Catálisis ácida o básica	Productos de condensación Gemdiol, Tautomerización	Haloperidol, Triamcinolona
Nitrilos	Hidrólisis ácida + descarboxilación	Base + CO ₂	Cimetidina, Difenoxilato
Aminas	Oxidación	N-Óxido	Dibucaina, Dorzolamida
Imina	Hidrólisis ácida o básica	Amina + cetona	Diazepam
Hidrazina	Hidrólisis ácida o básica	Base + Hidrazona	Isoniacida
Nitro	Fotooxidación + oxidación	Aromatización	Nifedipina
Sulfonamidas	Hidrólisis ácida	Sulfonamida + producto de hidrólisis	Brinzolamida
Sulfonilureas	Hidrólisis ácida	Sulfonamida + amina	Glibenclamida

Tiol, éter, tioéter	Oxidación / hidrólisis	Oxidación / Productos de hidrólisis	Mitomycin C
Alcoholes	Deshidratación	Alqueno, rearrreglo, oxidación	Butorfanol, Lovastatina, Montelukast
Fenoles	Oxidación	Cetona, rearrreglo	Epinefrina
Halogenuros de alquilo	Hidrólisis	Alcohol, eliminación	Melfalan
Bencilo	Oxidación	Cetona	Ciclandelato
Olefinas	Isomerización, oxidación	Isómeros geométricos, productos de oxidación	Tiotixeno, Montelukast, Sunitinib

7. INVESTIGACIONES PARA DETERMINAR LA CAUSA RAÍZ DE UN PROBLEMA

Al haber una excursión en un proceso se genera un descontrol en las especies reactantes y puede generarse una impureza. Como se ha comentado previamente se puede aislar y conocer la estructura. Aunque la elucidación estructural es un trabajo muy laborioso, el verdadero problema no es ese, el problema es cómo se evita que el evento vuelva a suceder. Para poder erradicar y prevenir que el evento no deseado sea recurrente, es necesario hacer una investigación que nos lleve a la causa raíz de la problemática. En este contexto existen diferentes metodologías para poder realizar este tipo de investigaciones. De hecho, la *Food Drug Administration* publicó un manual para poder determinar la causa raíz de una problemática determinada [46]. Básicamente este documento indica la utilización de herramientas metodológicas para determinar la causa raíz, y una vez determinada se propone la instauración de acciones correctivas o preventivas (*Corrective Actions/Preventive Actions*, CAPA) para evitar que el evento anómalo se repita. Finalmente, se debe dar seguimiento para asegurar que la medida fue eficaz y verificar las tendencias del parámetro corregido. Algunas herramientas útiles para elucidar la causa raíz de una problemática son:

- lluvia de ideas,
- mapeo de proceso
- relación de causa y efecto
- 5 porqués

7.1. La lluvia de ideas es una de las herramientas más populares para determinar una causa raíz, básicamente se reúne un equipo multidisciplinario y se dice todo lo que se sabe del proceso y que puede ser lo que ocasionó el problema, es importante destacar que no se debe omitir ninguna idea por sencilla que parezca. A menudo la causa raíz de una problemática se encuentra en los pequeños detalles.

7.2. El mapeo de proceso es una representación visual del proceso, en este flujo de proceso se puede detectar que es lo que se hizo diferente en el proceso cuestionado con respecto al proceso estándar. También sirve para acotar la búsqueda de la causa raíz, ya que puede segmentarse a una parte del proceso lo que tiene como resultado enfocar los esfuerzos en la parte del proceso que tiene la problemática.

7.3. Diagrama de causa y efecto o de espina de pescado. Esta herramienta incluye categorías que pueden depender del escenario. Se suelen evaluar categorías como personal, material, ambiente método y máquinas. La idea de esta herramienta es evaluar estos temas para generar subcategorías que ayuden a identificar la causa raíz de una problemática.

7.4. Los 5 porqués. Esta herramienta se basa en preguntarse 5 veces seguidas el porqué de una problemática. Con esta herramienta se pueden eliminar las causas superficiales y encontrar la causa raíz de una problemática. Alternativamente, existen otras herramientas de la metodología Lean six sigma que pueden ser utilizadas para determinar la causa raíz [47]. Una vez determinada la causa raíz, se deben establecer medidas correctivas o preventivas para evitar que se repita la problemática. Posterior a estos eventos se debe seguir el proceso para corroborar que la acción implementada en las acciones correctivas / preventivas fueron adecuadas. Finalmente, es necesario mencionar que el establecimiento de CAPA's sin un adecuado plan de acción son una de las principales observaciones que las agencias regulatorias proporcionan a los fabricantes.

8. CONTROL DE LAS IMPUREZAS

Establecer una medida de control generalizada es muy difícil ya que depende de las características de las moléculas involucradas, así como las condiciones de reacción, equipos de fabricación utilizados y el tipo de excursión observada. Consecuentemente se deben establecer actividades de control a la medida del proceso.

- a) Por ejemplo, una impureza proveniente de la **materia prima**, solo se puede mitigar con especificaciones estrictas que controlen el contenido de esta impureza, por norma general las impurezas muy similares en la cual la diferencia estructural entre el producto y la impureza sea de un metilo o un etilo, el producto generado prácticamente no se purifica.
- b) En el caso de impurezas **dímero, trímero**, estas se forman en concentraciones altas de reactivos con respecto al disolvente. Si es necesario evitarlas se puede aumentar la dilución para disminuir el contacto entre reactivos y producto favoreciendo el contacto reactivo vs materia prima. También se pueden utilizar rampas lentas de calentamiento para favorecer la homogeneidad de la reacción al inicio del proceso.
- c) Si el problema es la **cantidad de agua** en el producto, el agua que participa en el sistema se puede controlar estrictamente, incluyendo disolventes anhidros, controles para la determinación de agua, destilaciones azeotrópicas, o reflujo con el disolvente de reacción para eliminar el agua residual de un equipo.
- d) En el caso de encontrarse con una **forma polimórfica** diferente esto requiere estudios mucho más exhaustivos para el control, no obstante, se tiene la alternativa de utilizar una siembra con la adecuada forma sólida que permita obtener el producto deseado.
- e) Tal como lo muestra el caso 5 la formación de sales a veces es posible, por lo tanto, si en el proceso original se observa una reacción que utiliza una base y un ácido es muy probable que como subproducto se pueda obtener una sal [48]. En estos casos es de vital importancia limitar la cantidad de reactivos a adicionar y así mismo la cantidad de agua del sistema ya que puede fungir como catalizador.
- f) La generación de nuevas moléculas con fragmentos estructurales similares en ocasiones está asociadas a reacciones con condiciones de reacción agresivas. Por ejemplo, calentamientos a altas temperaturas pueden generar rearrreglos o nuevas moléculas en la reacción. Rampas de calentamiento lentas, entradas de servicios a los reactores limitados a ciertas temperaturas minimizan la generación de impurezas. Concerniendo el pH, este en ocasiones juega un papel decisivo ya que puede catalizar una reacción con respecto a otra. Por otra parte, si la molécula carece de similitud estructural probablemente se trata de una contaminación cruzada en cuyo caso será necesario revisar los procedimientos de limpieza.
- g) **¿Reacción con un excipiente?** Es poco probable, pero la ventaja es que las variables están limitadas, ya que solo hay excipientes, sustancia activa y condiciones de reacción. Un dato

con mucho peso es que la fabricación de muchos de los excipientes comerciales no tiene el nivel de calidad que se tiene en la fabricación de sustancias activas en la cual se llevan a cabo buenas prácticas de fabricación. Es decir, si la impureza se genera con un excipiente es necesario cambiar de proveedor y reevaluar el proceso. Muchos excipientes contienen residuos del proceso de fabricación. Por ejemplo, la povidona contiene peróxidos, o la lactosa contiene aldehídos y agentes reductores, tan solo por poner dos ejemplos. Se recomienda consultar el trabajo de Fathima *et al.* acerca del tema [49].

- h) En el ejemplo 10, se hace alusión al impacto de un jarabe con un catalizador que hace que se inicie el proceso de degradación de la sustancia activa. Este fenómeno se acentúa por el impacto de la luz y el oxígeno. La medida correctiva propuesta más simple es cambiar el excipiente, ya que el catalizador no fue determinado. La segunda propuesta sería incluir un inhibidor radicalario y cambiar el envase del medicamento a ámbar.

Adicionalmente Prabu & Suriyaprakash puntualizan cuatro causas adicionales que pueden derivar en la obtención de impurezas [21].

- 1) En las etapas de cristalización **la calidad y el tamaño determina del cristal** impacta la calidad y la estabilidad de la molécula sintetizada. Por ejemplo, trazas de disolventes que queden ocluidas pueden impactar en el tamaño y la estabilidad del cristal que a su vez puede causar degradación del medicamento.
- 2) **Lavados de las tortas aisladas.** Las sustancias activas tienen procesos de síntesis establecidos, habitualmente la última etapa de cristalización es aislada mediante centrifugación. Es decir, aislar un sólido de un líquido que contiene impurezas. La fuerza centrífuga elimina el disolvente residual y es necesario hacer lavados con disolvente que elimine el exceso de impurezas. Esta operación unitaria es crucial para obtener perfiles de impurezas adecuados. Cuando se obtienen impurezas de proceso fuera de especificación, probablemente se trata de una desviación en el lavado de la torta.
- 3) **Secado.** Los secados en equipos rotarios con vacío y temperatura son preferibles a la utilización de un secado de bandejas en el cual el producto está estático y recibiendo toda la carga térmica que puede derivar en impurezas puntuales por sobreexposición a la temperatura.
- 4) **Empacado final.** Las sustancias activas deben empacarse adecuadamente en función de su naturaleza. Por ejemplo, si es lábil al agua, se debe poner agente desecante. Si es impactado por la luz se deben utilizar bolsas que no permitan el paso de la luz. Si el problema es el oxígeno, se deben termosellar en una bolsa adecuada (por ejemplo, de aluminio) para que no haya intercambio con el medio ambiente.

Por otro lado, las sales orgánicas farmacéuticas son una interesante alternativa para purificar sustancias activas ya sea como etapas adicionales de purificación o como alternativas en la purificación de sustancias activas [50].

9. UTILIZACIÓN DE LAS IMPUREZAS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las impurezas pueden afectar la salud del paciente por dicho motivo es necesario asegurar que las medicinas y las sustancias activas sean seguras. No obstante, las impurezas también pueden utilizarse para otras actividades relacionadas con el desarrollo de las sustancias activas o fabricación de medicamentos. En esta tesitura, Liu *et al.* compilan las principales razones por la que es necesario conocer las impurezas en una sustancia activa o en una forma farmacéutica [51]. Por ejemplo, se necesitan patrones para hacer confirmaciones específicas de las impurezas

y/o validaciones de métodos analíticos. Se utilizan también para hacer estudios toxicológicos. Otro uso es para probar la purga de los subproductos en los diferentes procesos esto ayuda a establecer especificaciones para los intermedios de proceso. También se pueden utilizar para establecer las vías de degradación es decir como el producto podría degradar en determinadas condiciones de almacenamiento. Esto entre otras aplicaciones.

Tabla 14. Requerimientos en los que se necesitan impurezas

Requerimientos regulatorios	Requerimientos técnicos y científicos
Calidad y seguridad de los productos	Optimización de los procesos productivos
Validación de métodos	Optimización del desarrollo y la formulación
Confirmación de especificaciones	Mejora de la eficacia
Determinación de los criterios de aceptación	Estudios toxicológicos
Fecha de caducidad, fecha de reanálisis, evaluación de vida media	Síntesis de impurezas para patrones de referencia
Estudios de estabilidad y de almacenamiento	Costos
Limites toxicológicos	Predicción de las vías de degradación

10. CONCLUSIÓN

Las sustancias activas, así como las medicinas deben ser seguras para el paciente, esto se logra siguiendo los lineamientos establecidos en los procesos de fabricación. No obstante, en ocasiones hay problemas puntuales asociados a equipos, procesos o mano de obra. Estos contratiempos en ocasiones generan impurezas. Con objeto de continuar con las fabricaciones y no afectar la entrega de principios activos o medicamentos que afectarían al paciente es necesario reaccionar rápidamente y convertirnos en “cazadores de impurezas”. Para ello es necesario seguir una metodología que oriente a la resolución de problemas. El aislamiento, la trazabilidad, la elucidación estructural y confirmación son herramientas que permitirán proporcionar una causa raíz de las problemáticas. Así mismo, las investigaciones robustas que permitan determinar corroborar la causa raíz de la problemática son mandatarias para evitar repetir el problema mediante el establecimiento de acciones correctivas o preventivas. Y finalmente, verificar que las acciones implementadas han sido eficientes para evitar la recurrencia. Los ejemplos citados en este trabajo son solo una gota en el mar de opciones que se pueden presentar, a pesar de ello, la metodología es aplicable a muchas de las problemáticas que pudieran encontrarse durante la fabricación de sustancias activas o formas farmacéuticas.

CONFLICTO DE INTERÉS

El autor declara no presentar ningún conflicto de interés

REFERENCIAS

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Impurities in new Drug products Q3B(R2)*. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use, Switzerland, 2006; 16 p. URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>. Consultado: 08 Jul 2024.
2. Food Drug and Administration. *FDA announces voluntary recall of several medicines containing valsartan following detection of an impurity*. Silver Spring (MD), 2018. URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>. Consultado: 08 Jul 2024.
3. A. Pozniak, L. Muller, M. Salgo, J.K. Jones, P. Larson & D. Tweats. Elevated ethyl methanesulfonate (EMS) in nelfinavir mesylate (Viracept, Roche): overview. *AIDS Res. Ther.*, 6, 18 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1186/1742-6405-6-18>

4. S.R. Chemburkar, J. Bauer, K. Deming, H. Spiwek, K. Patel, J. Morris, *et al.* Dealing with the impact of Ritonavir Polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Org. Process Res. Dev.*, **4**(5), 413–417 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1021/op000023y>
5. W. Rehman, L.M. Arfons & H.M. Lazarus. The rise, fall and subsequent triumph of Thalidomide: lessons learned in drug development. *Ther. Adv. Hematol.*, **2**(5), 291–308 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1177/2040620711413165>
6. Cofepris. *Norma oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas Prácticas de fabricación de fármacos*. Ciudad de México, 2016. URL: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424377&fecha=04/02/2016#gsc.tab=0. Consultado: 08 Jul 2024.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients* Q7. The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use, Switzerland, 2000; 49 p. URL: [http:// https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf](http://https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf). Consultado 08 Jul 2024.
8. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Impurities in new drug substances* Q3A(R2). The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use, Switzerland, 2006; 15 p. URL: [http:// https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2__Guideline.pdf](http://https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2__Guideline.pdf). Consultado 08 Jul 2024.
9. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Guideline for residual solvents* Q3C(R9). The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use, Switzerland, 2016; 50 p. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C%28R9%29_Guideline_MinorRevision_2024_2024_Approved.pdf. Consultado 08 Jul 2024.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk* M7 (R2). The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use; Switzerland, 2017; 32 p. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf. Consultado 08 Jul 2024
11. L. Muller, R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, *et al.* A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **44**(3), 198–211 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.12.001>
12. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Guideline for Elemental Impurities* Q3D(R2). The international Council for Harmonisation of Technical requirements for Pharmaceutical for Human use, Switzerland, 2022; 88 p. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308.pdf. Consultado 08 Jul 2024.
13. J.C. Ortiz-Lara, M.Y. Salvitano-Domínguez, E. Méndez-Campos & P.V. Robles-Salgado. Impurezas elementales en las sustancias activas: Una perspectiva general. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **52**(1), 11–58 (2023). URL: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/102095/88978>
14. Cofepris. *Norma oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de fabricación de medicamentos*. Ciudad de México, 2015. URL: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424575&fecha=05/02/2016#gsc.tab=0. Consultado 08 Jul 2024.
15. J.C. Ortiz-Lara, S. Flores-Teloxa, I.R. Contreras-Mora & A. Díaz, Impurezas orgánicas observadas en el proceso de manufactura de las Sustancias. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **47**(1), 7–24 (2016). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57956609002.pdf>
16. C. Pan, F. Liu & M. Motto. Identification of pharmaceutical impurities in formulated dosage forms. *J. Pharm. Sci.*, **100**(4), 1228–1259 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.22376>
17. N.V.V.S.S. Raman, A.V.S.S. Prasad & R. Reddy. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: A pharmaceutical industrial perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**(4), 662–667 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.039>
18. D. Kushwah, H.B. Patel, P.K. Sinha & P.K. Jana. Practical approach for the determination of response factors of impurities in drugs by HPLC. *E-J. Chem.*, **8**(4), 1504–1511 (2011). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1155/2011/462364>

19. R. Brito da Silva & C. Aparecida de Mattos. Critical success factors of a drug traceability system for creating value in a pharmaceutical supply chain (PSC). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16**(11), 1972 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph16111972>
20. S. Gorog. Critical review of reports on impurity and degradation profiling in the last decade. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **101**, 2–16 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.012>
21. S.L. Prabu & T.N.K. Suriyaprakash. Impurities and its importance in pharmacy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **3**(2), 66–71 (2010). URL: https://www.researchgate.net/publication/266864231_Impurities_and_its_importance_in_pharmacy
22. N. Rahman, S.N.H. Azmi & H.F. Wu. The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. *Acred. Qual. Assur.*, **11**, 69–74 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0095-y>
23. S.R. Shah, M.A. Patel, M.V. Naik, P.K. Pradhan & U.M. Upadhyay. Recent approaches of “impurity profiling” in pharmaceutical analysis: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **3**(10), 3603–3617 (2012). Doi: [http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.3\(10\).3603-17](http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.3(10).3603-17)
24. C.J. Mbah. Hyphenated analytical methods: Role in pharmaceutical analysis. *Acta Sci. Pharm. Sci.*, **2**(9), 67–68 (2018). URL: <https://actascientific.com/ASPS/pdf/ASPS-02-0123.pdf>
25. S. Zasa, S.M. Lucini, F. Sciascia, V. Ferrone, R. Cifelli, G. Carlucci & M. Locatelli. Recent advances in the separation and determination of impurities in pharmaceutical products. *Instrum. Sci. Technol.*, **43**(2), 182–196 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1080/10739149.2014.921792>
26. K.R. Dhangar, R.B. Jagtap, S.J. Surana & A.A. Shirkhedkar. Impurity profiling of drugs towards safety and efficacy: theory and practice. *J. Chil. Chem. Soc.*, **62**(2), 3543–3557 (2017). URL: <https://www.scielo.cl/pdf/jcchems/v62n2/art24.pdf>
27. M.N. Raju, N. Kolla, K. Mukkanti & R. Bandichhor. An efficient and large-scale synthesis of Olmesartan Medoxomil: Anti hypertensive drug. *Chem. Biol. Inter.*, **3**(1), 26–37 (2013). URL: <https://www.cbijournal.com/paper-archive/jan-feb-2013-vol-1/Research-Paper-4.pdf>
28. S.B. Madasu, N.A. Vekariya, N.M. Hari-Kiran, B. Gupta, A. Islam, P.S. Douglas & K.R. Babu. Synthesis of compounds related to the antimigraine drug eliptriptan hydrobromide. *Beilstein J. Org. Chem.*, **8**, 1400–1405 (2012). Doi: <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.162>
29. E. Tieger, V. Kiss, G. Pokol, Z. Finta, M. Dusek, J. Rohlicek, E. Skorepova & P. Brazda. Studies on the crystal structure and arrangement of water in sitagliptine L- Tartrate hydrates. *Crys. Eng. Comm.*, **18**, 3819–3831 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1039/C6CE00322B>
30. J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter & J. Morris. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharm. Res.*, **18**(6), 859–866 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1011052932607>
31. B.P. Chekal, J. Ewers, S.M. Guinness, N.D. Ide, K.R. Leeman, R.J. Post, *et al.* Palbociclib commercial manufacturing process development. Part III. Deprotection following by crystallization for API particle control. *Org. Process Res. Dev.*, **20**(7), 1217–1226 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00071>
32. S.A. Schildcrout, D.S. Risley & R.L. Kleemann. Drug-excipient interactions of Seproxetine Maleate hemihydrate: Isothermal stress methods. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**(10), 1113–1130 (1993). Doi: <https://doi.org/10.3109/03639049309063006>
33. J. Roy, M. Islam, A.H. Khan, S.C. Das, M. Akhteruzzaman, A.K. Deb & A.H.M. Alam. Diclofenac Sodium injection sterilized by autoclave and the occurrence of cyclic reaction producing a small amount of impurity. *J. Pharm. Sci.*, **90**(5), 541–544 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200105\)90:5<541::aid-jps1011>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200105)90:5<541::aid-jps1011>3.0.co;2-o)
34. C.M. Rojas. The Mislow–Evans rearrangement. En: C.M. Rojas (editor). *Molecular Rearrangements in Organic Chemistry*. Wiley & sons. Inc., 2015; pp. 569–626.
35. H. Ren, C.A. Strulson, G. Humprey, R. Xiang, G. Li, D.R. Gauthier & K. Maloney. Potassium isopropyl xanthate (IX): an ultra – efficient palladium scavenger. *Green Chem.*, **19**, 4002–4006 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1039/C7GC01765K>
36. C.E. Garret & K. Prasad. The art of meeting palladium specifications in active pharmaceutical ingredients produced by Pd-catalyzed reactions. *Adv. Synth. Catal.*, **346**, 889–900 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.200404071>

37. P. Thatipalli, R. Kumar, C. Bulusu, R. Chakka, P.R. Padi, A. Yerra & S.A. Bollikonda. Synthesis and characterization of an anti-psychotic drug substance, Olanzapine. *ARKIVOC*, 195-201 (2008). URL: <https://www.arkat-usa.org/get-file/23361/>
38. M.M.A. El Azziz, A.G. Melad & A.S. Ashour. Grindstone neutralization reaction for the preparation of various salts of carboxylic acids. *MOJ Bioorg. Org. Chem.*, **3**(2), 31-36 (2019). URL: <https://medcraveonline.com/MOJBOC/MOJBOC-03-00095.pdf>
39. T.T. Kararli, T.E. Needham, C.J. Seul & P.M. Finnegan. Solid state interaction of Magnesium Oxide and Ibuprofen to form a salt. *Pharm. Res.*, **6**(9), 804-808 (1989). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015983732667>
40. R.A. Seburg, J.M. Ballard, T.L. Hwang & C.M. Sullivan. Photosensitized degradation of losartan potassium in an extemporaneous suspension formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**(2), 411-422 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.030>
41. B.P. Kumar, R.K. Sahu, K.V.R. Murthy, S. Rao & B. Ramu. A review on mechanism, importance and methods of compatibility testing in formulation of dosage forms. *J. Chem. Pharm. Sci.*, **4**(4), 141-151 (2011).
42. K.R. Wadekar, M. Bhalme, S.S. Rao, K.V. Reddy & E. Balasubrahmanyam. Evaluating impurities in drugs (Part I of III). *Pharm. Technol.*, **36**(2), 46-51 (2012). URL: <https://www.pharmtech.com/view/evaluating-impurities-drugs-part-i-iii>
43. K.R. Wadekar, P. Ravi, M. Bhalme, S.S. Rao, K.V. Reddy & E. Balasubrahmanyam. Evaluating impurities in drugs (Part II of III). *Pharm. Technol.*, **36**(3), 58-72 (2012). URL: <https://www.pharmtech.com/view/evaluating-impurities-drugs-part-ii-iii>
44. K.R. Wadekar, P. Ravi, M. Bhalme, S.S. Rao, K.V. Reddy, L.S. Kumar & E. Balasubrahmanyam. Evaluating impurities in drugs (Part III of III). *Pharm. Technol.*, **36**(4), 76-86 (2012). URL: <https://www.pharmtech.com/view/evaluating-impurities-drugs-part-iii-iii>
45. M. Li. *Organic Chemistry of drug degradation*. RSC Drug Discovery Series, No. 29. RSC Publishing, London, 2012.
46. L. Stevens & B. Dense. *The guide to CAPA and root cause analysis in FDA-Regulated industries*. The FDA Group, LLC. 34 p. URL: http://cdn2.hubspot.net/hubfs/1706982/White_Papers/The%20Guide%20to%20CAPA%20and%20Root%20Cause%20Analysis%20in%20FDA-Regulated%20Industries.pdf
47. M.L George, D. Rowlands, M. Price & J. Maxey. *Lean Six Sigma Pocket Toolbook: A Quick Reference Guide to 100 Tools for Improving Quality and Speed*. McGraw-Hill, New York (NY), 2005; chapter 9, pp. 141-149.
48. J.C. Ortiz-Lara & A. Balderrábano-López. Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **48**(1), 18-42 (2017). URL: <https://rmcf.afmac.mx/importancia-de-las-sales-organicas-en-la-industria-farmaceutica/>
49. N. Fathima, T. Mamatha, H.K. Qureshi, N. Anitha & J.V. Rao. Drug excipient interaction and its importance in dosage form development. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **01**(06), 66-71 (2011). URL: https://japsonline.com/admin/php/uploads/125_pdf.pdf
50. J.C. Ortiz-Lara. Organic salts as a tool for pharmaceutical ingredient purification: Bibliographic review. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 184-218 (2024). URL: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/112981/91541>
51. K.-T. Liu & C.-H. Chen. Determination of impurities in Pharmaceuticals: Why and how? En: P. Pereira & S. Xavier (editores). *Quality Management and Quality Control - New Trends and Developments*. IntechOpen, London, 2019. Doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83849>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.C. Ortiz-Lara. Como ser un cazador de impurezas en las sustancias activas: una metodología y casos de estudio. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 175-206 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rccquifa.v54n1.119554>

Therapeutic adherence and patient management in schizophrenia during outpatient pharmacotherapeutic follow-up: A case report

Camila da Silva Lima^{1a*}, Joslene Lacerda Barreto^{2b}, Max Denisson Mauricio Viana^{2c} & Izabel Almeida Alves^{1,2d}

¹ State University of Bahia, Life Sciences Department, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Salvador, Bahia, Brazil

² Federal University of Bahia, Department of Medicine, Salvador, Bahia, Brazil

E-mails:

^a mila.llima@gmail.com

^b joslenebarreto@gmail.com

^c max.viana@ufba.br

^d izabel.alves@ufba.br

ORCID IDs:

^a <https://orcid.org/0000-0001-7743-9722>

^b <https://orcid.org/0000-0001-5056-1621>

^c <https://orcid.org/0000-0002-1650-4460>

^d <https://orcid.org/0000-0002-8935-6542>

*Corresponding author: mila.llima@gmail.com; (71) 994043424; Rua Silveira Martins, nº2555, CEP: 41150-000.

Received: May 17, 2024

Corrected: January 30, 2025

Accepted: February 6, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.114487>

SUMMARY

Therapeutic adherence and patient management in schizophrenia during outpatient pharmacotherapeutic follow-up: a case report

Introduction. Social stigmas and the constraining effects of chronic antipsychotic therapy are factors influencing low therapeutic adherence. This study presents a case with a favorable prognosis after seven months of pharmaceutical monitoring at a specialized public outpatient mental health center. **Case report.** The subject is a 29-year-old man diagnosed with schizophrenia (ICD F20.0), who recently experienced a psychotic episode with both positive and negative symptoms. The patient exhibited non-adherence to prescribed medications, including haloperidol, risperidone, nortriptyline, and diazepam, with no reported psychological therapy. Baseline objective data revealed a body mass index below reference values, and borderline blood pressure and capillary blood glucose levels. During consultations, pharmacotherapy-related problems (PRF) were identified, such as low therapeutic adherence, drug interactions, inappropriate administration frequency, inadequate treatment duration, and significant adverse reactions. Pharmaceutical interventions included health education, therapeutic adjustments in collaboration with the prescriber, and referrals to other services. Ultimately, psychometric scales confirmed

medication adherence and improvement in depressive and anxious symptoms. **Discussion.** Pharmacotherapeutic monitoring proved significantly relevant, facilitating not only the detection but also the resolution of PRF while fostering health improvement. **Conclusion.** In this context, it enabled the management of therapeutic efficacy and safety, thereby increasing the patient's prospects for greater social integration.

Keywords: Pharmacotherapeutic monitoring; Therapeutic adherence; Schizophrenia

RESUMEN

Adherencia terapéutica y manejo del paciente con esquizofrenia durante el seguimiento farmacoterapéutico ambulatorio: Reporte de caso

Introducción. Los estigmas sociales y los efectos limitantes de la terapia antipsicótica crónica son factores que influyen en la baja adherencia terapéutica. Este estudio presenta un caso con pronóstico favorable tras siete meses de seguimiento farmacéutico en un centro ambulatorio público especializado en salud mental. **Reporte de un caso.** El sujeto es un hombre de 29 años diagnosticado con esquizofrenia (CIE F20.0), que recientemente experimentó un episodio psicótico con síntomas tanto positivos como negativos. El paciente presentó incumplimiento de los medicamentos prescritos, incluidos haloperidol, risperidona, nortriptilina y diazepam, sin que se informara terapia psicológica. Los datos objetivos basales revelaron un índice de masa corporal por debajo de los valores de referencia, y niveles de presión arterial y glucosa en sangre capilar en el límite. Durante las consultas se identificaron problemas relacionados con la farmacoterapia (FRP), como baja adherencia terapéutica, interacciones medicamentosas, frecuencia de administración inadecuada, duración inadecuada del tratamiento y reacciones adversas significativas. Las intervenciones farmacéuticas incluyeron educación sanitaria, ajustes terapéuticos en colaboración con el prescriptor y derivaciones a otros servicios. Al final, las escalas psicométricas confirmaron la adherencia a la medicación y la mejoría de los síntomas depresivos y ansiosos. **Discusión.** El seguimiento farmacoterapéutico resultó significativamente relevante, facilitando no sólo la detección sino también la resolución de la PRF y fomentando la mejora de la salud. **Conclusión.** En este contexto, permitió gestionar la eficacia y seguridad terapéutica, aumentando así las perspectivas del paciente de una mayor integración social.

Palabras clave: Monitoreo farmacoterapéutico; adherencia terapéutica; Esquizofrenia

RESUMO

Adesão terapêutica e gerenciamento de um paciente com esquizofrenia durante Acompanhamento Farmacoterapêutico ambulatorial: relato de caso

Introdução. Os estigmas sociais e os efeitos limitantes da terapêutica crônica com antipsicóticos são fatores que condicionam a baixa adesão terapêutica. Aqui apresentamos um caso com prognóstico favorável após sete meses de acompanhamento farmacêutico num centro ambulatorial público especializado em saúde mental. **Relato de caso.** Trata-se de um homem, 29 anos, com diagnóstico de esquizofrenia (CID F20.0), em episódio recente de surto psicótico, e evolução de sintomas positivos e negativos. Paciente não aderente à prescrição de haloperidol, risperidona, nortriptilina e diazepam, sem relato de terapia psicológica. Dados objetivos basais revelaram índice de massa corporal abaixo dos valores referenciais e pressão arterial e glicemia capilar limítrofes. Nos atendimentos foi possível identificar problemas relacionados à farmacoterapia (PRF), como baixa adesão terapêutica, interações medicamentosas, frequência de administração e tempo de duração do tratamento inadequados e reações adversas importantes. As intervenções farmacêuticas consistiram em educação em saúde, ajustes terapêuticos em consentimento com prescriptor e encaminhamentos para outros serviços. Ao final, através de escalas psicométricas, foi possível constatar adesão medicamentosa e melhora nos sintomas depressivos e ansiosos. **Discussão.** O acompanhamento farmacoterapêutico demonstrou significativa relevância, uma vez que viabilizou não somente a detecção, mas também a resolução de PRF, ao mesmo tempo em que

fomentou a melhoria da condição de saúde. **Conclusão.** Nesse contexto, possibilitou o manejo da eficácia e segurança terapêutica o que, por sua vez, aumentou as perspectivas do paciente para uma maior integração social.

Palavras-chave: Acompanhamento farmacoterapêutico; Adesão terapêutica; Esquizofrenia.

1. INTRODUCTION

Schizophrenia is a severe and disabling psychotic disorder that affects approximately 1% of the global population, involving emotional, cognitive, and behavioral alterations [1]. It manifests through positive symptoms such as delusions, hallucinations, disorganized speech, and behavior, as well as negative symptoms like affective impoverishment and lack of motivation [2]. These symptoms are associated with social stigmas and prejudices, further hindering patients' socialization and exacerbating factors that contribute to low adherence to therapies [3].

Therapeutic adherence can be defined as the degree to which an individual's behavior, concerning medication usage, aligns with recommendations agreed upon by a healthcare professional [4-6]. According to the World Health Organization, only half of patients with chronic diseases are considered adherent [6]. Factors contributing to low adherence encompass social and economic issues, as well as those related to therapy, the disease, the patient, and healthcare system-related factors [5, 6].

Patients with psychiatric disorders are more prone to not adhere to medication therapy due to a lack of understanding about their clinical condition and pharmacological treatment [7]. This low adherence reduces treatment effectiveness, leading to increased hospitalizations, reduced quality of life, higher healthcare costs, and suicide cases [7]. In the case of schizophrenia, studies reveal a non-adherence rate of 63-74% among patients [8].

From this perspective, patients should be regularly monitored, and clinical pharmacists can play a vital role in patient care by detecting, resolving, and preventing PRF. In this regard, we describe the successful management of a patient with schizophrenia during pharmacotherapeutic monitoring at a specialized public mental health outpatient center in Brazil.

The pharmacotherapeutic monitoring followed the clinical method adapted from the Ministry of Health of Brazil (Figure 1) [9]. In the anamnesis, an adapted pharmaceutical consultation script was employed to conduct an anthropometric evaluation, encompassing measurements such as weight, abdominal circumference, capillary glucose, and body mass index (BMI). Additionally, a scalometric evaluation was performed to measure the severity of anxiety and depression symptoms, as well as medication adherence using the General Anxiety Disorder (GAD-7) [10], Patient Health Questionnaire (PHQ-9) [11], and Medication Adherence Measure (MAT) [12], respectively. The GAD-7 and PHQ-9 have a cutoff value of 10, and a MAT score above 5 classifies the patient as adherent to pharmacological therapy. Patient monitoring occurred remotely through telephone communication and text messages via WhatsApp®.

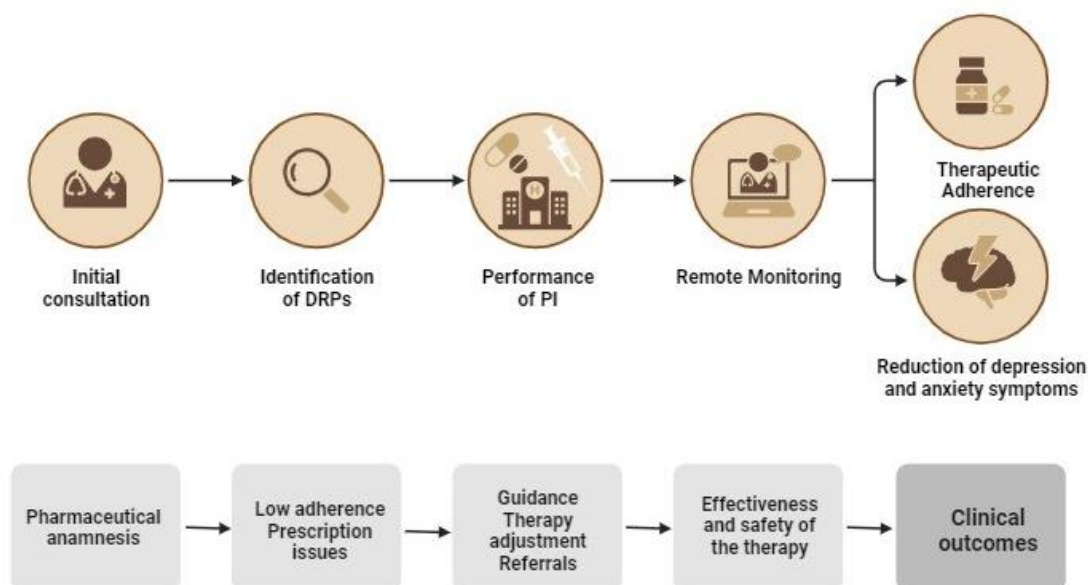


Figure 1: Steps of pharmaceutical care conducted for the management of a patient with schizophrenia. PI: pharmaceutical intervention; DRPs: Drug-Related Problems

2. CASE REPORT

A 29-year-old man, diagnosed with schizophrenia (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - ICD F20.0) 12 years ago, began treatment at the Child Psychosocial Care Center at the age of 17, where he remained for five years, and was later transferred to an adult psychiatric outpatient clinic. He commenced pharmaceutical monitoring in February 2022 due to issues of low therapeutic adherence, the need to monitor therapy effectiveness, and a recent history of a psychotic outbreak with aggression and the progression of some positive and negative symptoms. The consultations were attended by the patient's mother, who also served as his caregiver.

Regarding sociodemographic data, the patient reported being single, unemployed, having an incomplete elementary education, and residing with his mother. Concerning lifestyle, he denied alcohol and tobacco use and did not engage in physical exercises. He claimed to have good dietary habits; however, he was currently experiencing food refusal.

During the consultation, the patient's mother reported that since childhood, he had exhibited signs and behaviors suggestive of hallucinations, had difficulties in walking and speaking, experienced bullying at school, and had his first psychotic outbreak at the age of 17. During this period, he frequently ran away from school and home, being considered missing for a period. The patient denied having been diagnosed with other illnesses, and with regards to the family history, he had no knowledge of relatives with mental health issues.

With respect to the current history, approximately a week before the initial appointment, he presented extreme irritability and aggression, to the extent of physically assaulting his mother, who had to call the Mobile Emergency Care Service (SAMU). He was then transported to the psychiatric hospital, where he remained under observation for several hours. At the hospital, he expressed feelings of emotional exhaustion. The patient and his mother were facing financial difficulties, both unemployed, with no income and no support network, as his father had passed away the previous year due to a coronavirus infection.

During the first pharmaceutical consultation, the patient was still recovering from the psychotic outbreak, displaying signs of irritability and occasional aggression. He reported complaints of muscle pain, headaches, insomnia, and blurred vision. Delusional ideas, thinness (BMI 17.54 Kg/m²), and bradykinesia were observed during the consultation. The patient did not have recent laboratory tests and mentioned not having any for over a year. Anthropometric and scalometric data are described in Table 1.

Table 1. Clinical parameters verified during the first and last pharmaceutical consultation and therapeutic goal established according to guidelines.

PARAMETERS	FIRST CONSULTATION	LAST CONSULTATION	GOAL ⁽¹³⁻¹⁵⁾
BP (mmHg)	120X80	120X80	Ideal: 120/80 mmHg
BGT (mg/dL)	104	107	Ideal: Less than 140 mg/dL
Weight (Kg)	61,3	64,6	Ideal: Between 65 and 87 Kg
BMI (Kg/m ²)	17,54	18,50	Ideal: Between 18.5 - 24.9 Kg/m ²
WC (cm)	71	75	Ideal: Less than 94 cm
PHQ-9	21	12	Ideal: Below 10
GAD-7	18	8	Ideal: Below 10
MAT	4,28	5,43	Ideal: Above 5

BP: blood pressure; BGT: blood glucose test; BMI: body mass index; WC: waist circumference; PHQ-9: Patient Health Questionnaire; GAD-7: Generalized Anxiety Disorder; MTA: Measure Therapeutic Adherence.

Regarding medication use, the patient denied self-medication, the use of herbal teas, or other therapeutic options. The details of prescribed medications and dosing regimens assessed at the beginning of pharmaceutical monitoring are described in Figure 2. At this point, polypharmacy with psychotropic drugs, drug interactions, inappropriate dosing frequency of nortriptyline, extended diazepam use, and limiting adverse reactions were identified, such as extrapyramidal effects of antipsychotics in the absence of central anticholinergics.



Figure 2. Medications used continuously at the beginning and end of Pharmaceutical Care.

The caregiver and the patient could not accurately report the exact duration of benzodiazepine use but estimated it to be approximately two to three years. In addition to this, there was observed low adherence to psychotropic therapy, with reports of dose increases, reductions, and frequent omissions by the patient's own decision. The PHQ-9 (21) and GAD-7 (18) scores indicated severe symptoms of depression and anxiety, partly attributed to low medication adherence (MAT 4.53) (Table 1).

The pharmacist carried out interventions to optimize the therapy, suggesting the discontinuation of haloperidol and the continuation of risperidone as monotherapy to the prescribing physician. It was also suggested to initiate the use of biperidene, an anticholinergic drug to reverse extrapyramidal effects, adjust the dosing frequency of nortriptyline to once daily, and gradually discontinue diazepam. Given the medical refusal to discontinue haloperidol, a request was made for a change in the pharmaceutical form from solution to tablets (due to the patient's complaint about the unpleasant taste of the medication). Furthermore, the patient and caregiver were reinforced on the importance of adherence and adherence to the medical prescription.

In addition to interventions for psychotropic therapy adjustment, the pharmacist provided counseling on general health, including the promotion of healthier measures such as physical exercise, a balanced diet, increased water intake, and the provision of referral letters to other services, such as general practitioners, ophthalmology, nutrition, psychology, and social services. A table describing the medications and dosing times, educational material (leaflet on medication adherence), and a list of free psychology services were also created and made available.

To assess the patient's clinical progress, goals were established throughout the monitoring process based on reference standards established in the literature [13-15] (Table 1). During remote monitoring, reports on sleep quality, appetite/food intake, bowel function, signs of persecution, hallucinations, irritability, social interaction, and complaints of adverse reactions were tracked. Remote contact was primarily through the patient's mother, who, in the first two appointments, reported that the patient was very sleepy, tearful, verbalizing that "his life had no importance," with statements such as "feeling very alone, without friends, and without employment".

In the fifth remote appointment, the complaint of sialorrhea was reported. After investigation and confirmation with the patient, it was discovered that he was using haloperidol incorrectly and taking extra doses instead of biperidene. The caregiver and the patient were again educated about the proper use of medications, emphasizing treatment goals.

In the 7th and final consultation, conducted in person, the patient showed substantial improvements in the assessed parameters. He reduced the severity of anxiety and depression symptoms by 55.5% and 42.8%, respectively, as measured by psychometric scales, and displayed a slight weight gain and an increase in abdominal circumference, progressing from underweight to normal weight. He became adherent to pharmacological therapy, demonstrating behavioral improvement, expressing a willingness to share family activities and routines, reducing thoughts of worthlessness, decreasing irritability, aggression, and delusional ideas. Furthermore, he showed an interest in physical activity and no longer experienced sialorrhea.

This case report is part of a study approved by the Ethics Committee of the Federal University of Bahia under CAAE: 28844820.3.0000.8035; #3,978,405/2020.

3. DISCUSSION

This narrative discusses psychotropic therapy adherence and the management of a patient diagnosed with schizophrenia during pharmaceutical monitoring at a psychiatric outpatient clinic. Through this approach, it was possible to identify and address Medication-Related Problems (MRPs), create a care plan that included monitoring, goal setting, and pharmaceutical interventions, primarily related to health education, therapy adjustments, and referrals. Collectively, the coordination of these steps resulted in a positive prognosis for the patient.

The pharmaceutical monitoring lasted for 7 months, including two in-person consultations (initial and final) and four remote monitoring sessions. Of the pharmaceutical interventions carried out, the prescribing physician chose not to discontinue haloperidol. Still, the dosing frequency of risperidone was reduced to twice daily, biperidene was added, diazepam was discontinued, and the dosing frequency of nortriptyline was adjusted to daily use. The therapy at the end of the monitoring period consisted of haloperidol 5 mg/day, risperidone 3 mg twice daily, biperidene 2 mg twice daily, and nortriptyline 25 mg/day (Figure 2).

Monotherapy for schizophrenia is recommended by the Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines (PCDT) provided by the Brazilian Ministry of Health [16]. The evidence base for polypharmacy with psychotropic drugs in schizophrenia treatment is generally scarce, but it can be justified in certain clinical situations. However, the risk-benefit should be evaluated, and adverse effects should be carefully monitored [17].

Due to polypharmacy, the patient had the potential for interactions between haloperidol and risperidone, haloperidol and diazepam, and haloperidol and nortriptyline, with a potential risk of anticholinergic effects and central nervous system depression. The appropriate course of action was therapy monitoring and the interventions that were carried out, according to Lexicomp® [18].

The assessment of medication adherence can be ascertained through objective methods, such as clinical outcome measurements, dose counting, pharmacy records, and electronic monitoring of drug administration. These methods have the potential to more accurately measure treatment adherence, but often involve higher costs [19]. On the other hand, subjective methods involve the evaluation of patient behavior and the collection of information about medication use. Typically, these methods utilize questionnaires, which, although subject to biases, allow for tracking and predicting patients' medication usage patterns [19].

In this study, the Medication Adherence Measurement Scale, validated by Borba et al. (2018), was chosen to assess the patient's adherence to mental health treatment [20]. Non-adherence by the patient was identified, and several factors may be related to this lack of adherence, including individual patient characteristics, prescribed medications, and the interaction between the patient and healthcare services [6]. Additionally, the patient's clinical condition may contribute to the lack of interest and discipline in following pharmacological therapy. Consequently, interventions were carried out, involving guidance and counseling on the disease and treatment, as well as the provision of educational materials.

The observed increase in medication adherence following the monitoring period may have been achieved through these interventions, as well as the intention to minimize treatment complexity. Studies support the association between the number of medications and their impact on patient adherence [21-23]. Encouraging the reduction of the number of medications, when possible, not only promotes adherence but also helps reduce adverse effects, lower healthcare costs, and enhance medication rationalization.

In this perspective, the discontinuation of benzodiazepines has been discussed and emphasized in the scientific literature. It is recommended that benzodiazepines be limited to a period of 2 to 4 weeks to avoid the risk of dependence [24]. In contrast to current literature, the patient had been using diazepam for about two to three years without positive results for insomnia and anxiety.

Furthermore, diazepam is not the first-line drug for insomnia because it has a long duration of effect and can lead to metabolite accumulation, increasing the likelihood of interference with REM (Rapid Eye Movement) sleep, rebound drowsiness, dizziness, and falls [25]. In par-

allel with the gradual diazepam withdrawal process, the patient received guidance for participation in psychotherapy sessions, considering that approaches that include psychological interventions offer positive results in the treatment of insomnia [26, 27].

The importance of pharmaceutical activities, including pharmacovigilance, was highlighted in this specific case, where the identification of adverse drug reactions (extrapyramidal reaction and sialorrhea) resulting from haloperidol use was conducted. To determine the likelihood of haloperidol causing these Adverse Drug Reactions (ADRs), the Naranjo Probability Scale was used [28] (Table 2). The score obtained for extrapyramidal reaction was 5 points, indicating this reaction as probable due to haloperidol use, reinforced by the inclusion of biperidene.

Table 2. Naranjo Probability Scale with questions, corresponding point values, and score interpretation adapted for the patient to determine the probability of haloperidol causing extrapyramidal syndrome and sialorrhea.

Questions	Yes	No	Unknown/Not Applicable	Sum of Scores Extrapyramidal syndrome	Sum of Scores Sialorrhea
1. Is the adverse reaction expected for this drug?	+1	0	0	+1	+1
2. Did the reaction occur after drug administration?	+2	-1	0	+2	+2
3. Did the reaction improve when the drug was discontinued?	+1	0	0	0	0
4. Did the reaction reappear upon drug re-administration?	+2	-1	0	0	0
5. Are there alternative causes? (e.g., underlying disease)	-1	+2	0	-1	-1
6. Does the reaction reappear with the introduction of a placebo?	-1	+1	0	0	0
7. Is the plasma concentration at a toxic level?	+1	0	0	0	0
8. Did the reaction increase with a higher dose or decrease with a lower dose?	+1	0	0	+1	+1
9. Has the patient experienced a similar reaction previously with a drug from the same therapeutic class?	+1	0	0	+1	0
10. Was the reaction confirmed by any objective evidence?	+1	0	0	+1	+1
			Total	5	4

Scoring for the Naranjo Algorithm: > 9 = definite; 5-8 = probable; 1-4 = possible; 0 = doubtful.

Regarding sialorrhea, the score was 4 points, suggesting that this could have been triggered by haloperidol use, further reinforced by the disappearance of the reaction after reducing the dose of the suspected medication (Table 2). Studies addressing this topic have emphasized the critical role of pharmacists in managing medication-induced adverse reactions, including their contribution to improved treatment adherence [7, 29, 30].

A significant approach that demonstrated relevance for the patient's successful management was the screening of specific health conditions. The PHQ-9 and GAD-7 scores observed

at the beginning of pharmaceutical monitoring were high, representing severe depression and anxiety, respectively. These comorbidities are found among patients with schizophrenia, with prevalence rates of up to 50% for depression and 38% for anxiety [29]. In these situations, depressive symptoms not only increase the level of suffering of the negative affective state of schizophrenia but are also associated with more frequent psychotic episodes, longer illness duration, substance misuse, poor quality of life, and suicide risk [31, 32].

By using these scales as monitoring tools, it was possible to conduct well-founded interventions and assess the effectiveness of the approaches implemented during the patient's clinical course. Thus, the contribution of the clinical pharmacist proved to be of paramount importance, enabling the recovery of symptoms in a patient diagnosed with schizophrenia after a psychotic outbreak period.

4. CONCLUSION

Pharmaceutical monitoring played a crucial role in reducing symptoms, encouraging adherence, as it addressed the patient's needs while interacting with a multidisciplinary team. In this context, pharmaceutical monitoring not only enabled the monitoring of the effectiveness and safety of pharmacological therapy but also referrals to other clinical healthcare services. Besides the aspects directly related to therapy, the monitoring had a positive impact on the patient's mental health, offering new prospects for social integration. Experiencing improvements in his condition, the patient showed an increased ability to engage in social activities and establish interpersonal connections, ultimately enhancing his quality of life and emotional well-being.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. R.A. McCutcheon, T.R. Marques & O.D. Howes. Schizophrenia—An overview. *JAMA Psychiatry*, **77**(2), 201–210 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.3360>
2. G. Guaiana, M. Abbatecola, G. Aali, F. Tarantino, I.D. Ebuenyi, V. Lucarini, W. Li, C. Zhang & A. Pinto. Cognitive behavioural therapy (group) for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **7**(7), CD009608 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009608.pub2>
3. P. Saparia, A. Patel, H. Shah, K. Solanki, A. Patel & Maulin Sahayata. Schizophrenia: A systematic review. *Clin. Exp. Psychol.*, **09**(01), 008-013 (2022). URL: <https://www.iomcworld.org/open-access/schizophrenia-a-systematic-review.pdf>
4. C. Carratalá-Munuera, E. Cortés-Castell, E. Márquez-Contreras, J.M. Castellano, M. Perez-Paramo, A. López-Pineda & V.F. Gil-Guillen. Barriers and solutions to improve therapeutic adherence from the perspective of primary care and hospital-based physicians. *Patient Prefer. Adherence*, **16**, 697–707 (2022). URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8923680/>
5. A. Gast & T. Mathes. Medication adherence influencing factors—an (updated) overview of systematic reviews. *Syst. Rev.*, **8**(1), 112 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1014-8>
6. A.E. Kasahun, A.K. Sendekie, G.A. Mekonnen, F.D. Sema, L.K. Kemal & R.B. Abebe. Impact of personal cultural and religious beliefs on medication adherence among patients with chronic diseases at University Hospital in Northwest Ethiopia. *Patient Prefer Adherence*, **16**, 1787–1803 (2022). Doi: <https://doi.org/10.2147/PPA.S370178>

7. A. Semahegn, K. Torpey, A. Manu, N. Assefa, G. Tesfaye & A. Ankomah. Psychotropic medication non-adherence and its associated factors among patients with major psychiatric disorders: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.*, **9**(1), 17 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13643-020-1274-3>
8. E. Loots, E. Goossens, T. Vanwesemael, M. Morrens, B.V. Rompaey & T. Dilles. Interventions to improve medication adherence in patients with schizophrenia or bipolar disorders: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**(19), 10213 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph181910213>
9. Brasil, Ministério da Saúde. *Cuidado Farmacêutico na Atenção Básica. Caderno 2: Capacitação para implantação dos serviços de clínica farmacêutica*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, Brasília, DF, 2014; 306 p. URL: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cuidado_farmaceutico_atencao_basica_saude_2.pdf
10. S. Kertz, J. Bigda-Peyton & T. Bjorgvinsson. Validity of the Generalized Anxiety Disorder-7 Scale in an acute psychiatric sample. *Clin. Psychol. Psychother.*, **20**(5), 456–464 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1002/cpp.1802>
11. I.S. Santos, B.F. Tavares, T.N. Munhoz, L.S.P.d. Almeida, N.T.B.d. Silva, B.D. Tams, A.M. Patella & A. Matijasevich. Sensibilidade e especificidade do Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) entre adultos da população geral. *Cad Saúde Pública* (Rio de Janeiro) **29**(8), 1533-1543 (2013). URL: <https://www.scielo.org/pdf/csp/2013.v29n8/1533-1543/pt>
12. D.A. Barata & M.L. Lima. Contributo para a validação concorrente de uma medida de adesão aos tratamentos. *Psicologia, Saúde e Doenças*, **II**(2), 81–100 (2001). URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36220206>
13. Sociedade Brasileira de Diabetes. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020*. Clannad Editora Científica, 2019; 491 p. URL: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/08/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-20201.pdf>
14. W.K.S. Barroso, C.I.S. Rodrigues, L.A. Bortolotto, *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq. Bras. Cardiol.*, **116**(3), 516–658 (2021). Doi: <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>
15. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. *Diretrizes brasileiras de obesidade*, 2016, 4.ed. São Paulo, SP, 2016; 188 p. URL: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf>
16. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 364, de 9 de abril de 2013: Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Esquizofrenia. URL: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0364_09_04_2013.html
17. L. Baandrup. Polypharmacy in schizophrenia. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **126**(3), 183–192 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13384>
18. Lexicomp®. (n.d.). *Drug interactions*. UpToDate. URL: <https://www.uptodate.com/druginteractions>. Accessed January 3, 2024.
19. L.A. Anghel, A.M. Farcas & R.N. Oprean. An overview of the common methods used to measure treatment adherence. *Med. Pharm. Rep.*, **92**(2), 117–122 (2019). Doi: <https://doi.org/10.15386/mpr-1201>
20. L.O. Borba, F.C. Capistrano, A.C.Z. Ferreira, L.P. Kalinke, M.d.F. Mantovani & M.A. Maftum. Adaptation and validation of the Measuring of Treatment Adherence for mental health. *Rev. Bras. Enferm.*, **71**(suppl 5), 2243-2250 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2017-0796>
21. E. Wakai, K. Ikemura, C. Kato & M. Okuda. Effect of number of medications and complexity of regimens on medication adherence and blood pressure management in hospitalized patients with hypertension. *PLoS One*, **16**(6), e0252944 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252944>
22. S.J. Kim, O.D. Kwon, E.B. Han, C.M. Lee, S.-W. Oh, H.-K. Joh, B. Oh, H. Kwon, B. Cho & H.C. Choi. Impact of number of medications and age on adherence to antihypertensive medications: A nationwide population-based study. *Medicine* (Baltimore), **98**(49), e17825 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017825>

23. L.L. Pantuzza, M.G.B. Ceccato, M.R. Silveira, L.M.R. Junqueira & A.M.M. Reis. Association between medication regimen complexity and pharmacotherapy adherence: a systematic review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **73**(11), 1475–1489 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2315-2>
24. P.R.S. Ribeiro & A.D. Schlindwein. Benzodiazepine deprescription strategies in chronic users: a systematic review. *Fam. Pract.*, **38**(5), 684–693 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/fampra/cmab017>
25. L.A.M. Marques. *Cuidado Farmacêutico: Pacientes Com Doenças Psiquiátricas*. v. 5. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2019; 310 p.
26. A. Also-Fontanet, B. Kostov, J. Benavent-Àreu, M. Pinyol-Martínez, J.M. Sotoca-Momblona, A. Benabarre-Hernández & A. Sisó-Almirall. Pilot psychotherapy program for the deprescription of benzodiazepines for anxiety disorders. *Ansiedad y Estrés*, **28**(1), 71–77 (2021). URL: <https://www.ansiedadystres.es/sites/default/files/rev/2022/anyes2022a8.pdf>
27. E. Reeve, M. Ong, A. Wu, J. Jansen, M. Petrovic & D. Gnjdic. A systematic review of interventions to deprescribe benzodiazepines and other hypnotics among older people. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **73**(8), 927–935 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2257-8>
28. C.A. Naranjo, U. Busto, E.M. Sellers, P. Sandor, I. Ruiz, E.A. Roberts, E. Janecek, C. Domecq & D.J. Greenblatt. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **30**(2), 239–245 (1981). Doi: <https://doi.org/10.1038/clpt.1981.154>
29. M. Karuppannan, N.A.N. Mohamad, K.T. Wong, S.M. Ali, K.-N. Ting & H. Boardman. Pharmacists' experiences on adverse drug reaction: 10 years later. *Front. Pharmacol.*, **13**, 932942 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.932942>
30. Y. Jiang, R. Lu, M. Ou, Q. Zhou, Z. Du & H. Zhu. Application of “Internet +” pharmaceutical consultation services in psychiatric hospital during the epidemic. *Asian J. Psychiatr.*, **82**, 103532 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2023.103532>
31. S.M. Opoka & T.M. Lincol. The effect of cognitive behavioral interventions on depression and anxiety symptoms in patients with schizophrenia spectrum disorders: A systematic review. *Psychiatr. Clin. North Am.*, **40**(4), 641–659 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.psc.2017.08.005>
32. A. Gregory, P. Mallikarjun & R. Upthegrove. Treatment of depression in schizophrenia: Systematic review and meta-analysis. *Br. J. Psychiatr.*, **211**(4), 198–204 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.116.190520>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

C. da Silva-Lima, J. Lacerda-Barreto, M.D. Mauricio-Viana & I. Almeida-Alves. Therapeutic adherence and patient management in schizophrenia during outpatient pharmacotherapeutic follow-up: A case report. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 207–217 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.114487>

Antiviral effect of anthocyanins in vegetables and fruits against viral diseases: Insight to medication design by computational chemistry approaches

Fatemeh Mollaamin^{1*} & Majid Monajjemi²

¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey.

² Department of Chemical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author E-mail: fmollaamin@kastamonu.edu.tr

Received: April 19, 2024

Corrected: January 30, 2025

Accepted: February 6, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119556>

SUMMARY

Introduction: The probe for ideal medications with absolute antiviral activity against SARS-CoV-2 is still in place, and attention has been recently drawn to medicinal plants. **Aims:** To evaluate the several molecular targets as points of therapeutic intervention. **Methods:** Clusters of metal ions of Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} joined to anthocyanins in water media were studied for unraveling the color shifting of different complexes of these structures in the low ranges of pH using DFT/B3LYP/6–31G (d,p) method. **Results:** It has been studied the metal cations diffusing of deprotonating for the anthocyanin (B)-ring of Mal, Peo, Del, Pet, Cya in water and applying the IR method for getting the physico-chemical specifications of intensity, frequency, and absorbance of the compounds, respectively. It has been seen that by increasing the pH, the frequency of Al^{3+} Cya, Ga^{3+} Cya, Mg^{2+} Cya complexes increase between pH ≈ 1.1 -1.5. The change in Gibbs free energy change (ΔG) may be the best indicator of the protection offered by dietary stabilizers on anthocyanins, which demonstrated the best stabilizer among dietary compounds as Del with $\Delta G = -2.92 \times 10^{-5}$ kcal/mol. Furthermore, the partial charges and spin density have been gained by matching the electrostatic potential to atomic charge of O^{+17} , O^{+16} , and O^{+7} ions for $M^{n+}(31)$ Cya, $M^{n+}(32)$ Del and $M^{n+}(35)$ Pet, respectively. **Conclusions:** The anthocyanins discussed in this article indicate robust binding affinities and strong inhibitory molecular interactions with the target proteins and could be well exploited as potential medication candidates with potent multiple antiviral impacts against COVID-19 virus.

Keywords: COVID-19; anthocyanins; ion chelation; DFT.

RESUMEN

Efeito antiviral de antocianinas em vegetais e frutas contra doenças virais: uma visão do projeto de medicamentos por meio de abordagens de química computacional

Introducción: La investigación de medicamentos ideales con actividad antiviral absoluta contra el SARS-CoV-2 aún está en marcha, y recientemente se ha llamado la atención sobre las plantas medicinales. **Objetivos:** Evaluar los diversos objetivos moleculares como puntos de intervención terapéutica.

Métodos: Se estudiaron grupos de iones metálicos de Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} unidos a antocianinas en medios acuosos para desentrañar el cambio de color de diferentes complejos de estas estructuras en los rangos bajos de pH utilizando el método DFT/B3LYP/6-31G (d,p). **Resultados:** Se ha estudiado la difusión de cationes metálicos de desprotonación para el anillo de antocianina (B) de Mal, Peo, Del, Pet, Cya en agua y se ha aplicado el método IR para obtener las especificaciones fisicoquímicas de intensidad, frecuencia y absorbancia de los compuestos, respectivamente. Se ha visto que al aumentar el pH, la frecuencia de los complejos $Al^{3+}Cya$, $Ga^{3+}Cya$, $Mg^{2+}Cya$ aumenta entre pH $\approx 1,1-1,5$. El cambio en el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) puede ser el mejor indicador de la protección ofrecida por los estabilizadores dietéticos sobre las antocianinas, que demostraron ser el mejor estabilizador entre los compuestos dietéticos como Del con $\Delta G = -2.92 \times 10^{-5}$ kcal/mol. Además, las cargas parciales y la densidad de espín se han obtenido al hacer coincidir el potencial electrostático con la carga atómica de los iones O^{+17} , O^{+16} y O^{+7} para $M^{n+}(31)Cya$, $M^{n+}(32)Del$ y $M^{n+}(35)Pet$, respectivamente. **Conclusiones:** Las antocianinas analizadas en este artículo indican afinidades de unión robustas y fuertes interacciones moleculares inhibitorias con las proteínas objetivo y podrían ser bien explotadas como posibles candidatos a medicamentos con potentes impactos antivirales múltiples contra el virus COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19; antocianinas; quelación iónica; DFT.

RESUMO

Efecto antiviral de las antocianinas en verduras y frutas contra enfermedades virales: información sobre el diseño de medicamentos mediante enfoques de química computacional

Introdução: A sonda para medicamentos ideais com atividade antiviral absoluta contra SARS-CoV-2 ainda está em andamento, e a atenção foi recentemente atraída para plantas medicinais. **Objetivos:** Avaliar os vários alvos moleculares como pontos de intervenção terapêutica. **Métodos:** Clusters de íons metálicos de Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} unidos a antocianinas em meio aquoso foram estudados para desvendar a mudança de cor de diferentes complexos dessas estruturas nas baixas faixas de pH usando o método DFT/B3LYP/6-31G (d,p). **Resultados:** Foi estudada a difusão de cátions metálicos de desprotonação para o anel de antocianina (B) de Mal, Peo, Del, Pet, Cya em água e aplicando o método IR para obter as especificações físico-químicas de intensidade, frequência e absorvância dos compostos, respectivamente. Foi observado que ao aumentar o pH, a frequência dos complexos $Al^{3+}Cya$, $Ga^{3+}Cya$, $Mg^{2+}Cya$ aumenta entre pH $\approx 1,1-1,5$. A mudança na mudança de energia livre de Gibbs (ΔG) pode ser o melhor indicador da proteção oferecida pelos estabilizadores dietéticos em antocianinas, que demonstraram o melhor estabilizador entre os compostos dietéticos como Del com $\Delta G = -2.92 \times 10^{-5}$ kcal/mol. Além disso, as cargas parciais e a densidade de spin foram obtidas ao combinar o potencial eletrostático com a carga atômica dos íons O^{+17} , O^{+16} e O^{+7} para $M^{n+}(31)Cya$, $M^{n+}(32)Del$ e $M^{n+}(35)Pet$, respectivamente. **Conclusões:** As antocianinas discutidas neste artigo indicam afinidades de ligação robustas e fortes interações moleculares inibitórias com as proteínas alvo e podem ser bem exploradas como potenciais candidatos a medicamentos com múltiplos impactos antivirais potentes contra o vírus COVID-19.

Palabras clave: COVID-19; antocianinas; quelación iônica; DFT.

1. INTRODUCTION

A recent pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread worldwide and become pandemic with thousands new deaths and infected cases globally [1–6]. Natural drugs and herbs with their anti-inflammatory properties might have pleiotropic functions in COVID-19 treatment [7–11]. Some antibodies extracted from plants are supposed to answer very quickly to the emergence of recent variants of COVID-19 [12–19]. Anthocyanins are one of the four subclasses of Flavonoids which represent various beneficial impressions

consisting of antidiabetes, anticancer, antiallergy, antimutagenesis, cardioprotection, and antiviral activities [20–22]. One of the beneficial methods for discovering proper medication against COVID-19 can be molecular docking approach. This method can analyze the conformation and orientation of molecular structures into the binding zones of a macromolecular object [23]. Many research works have been remarked on the application of molecular docking method to determine or foretell the drug-object binding tendency with the viral protease [24–32]. The color of natural anthocyanins is changeable with concentration of H^+ in the liquid medium including weak acidic (Fig.1).

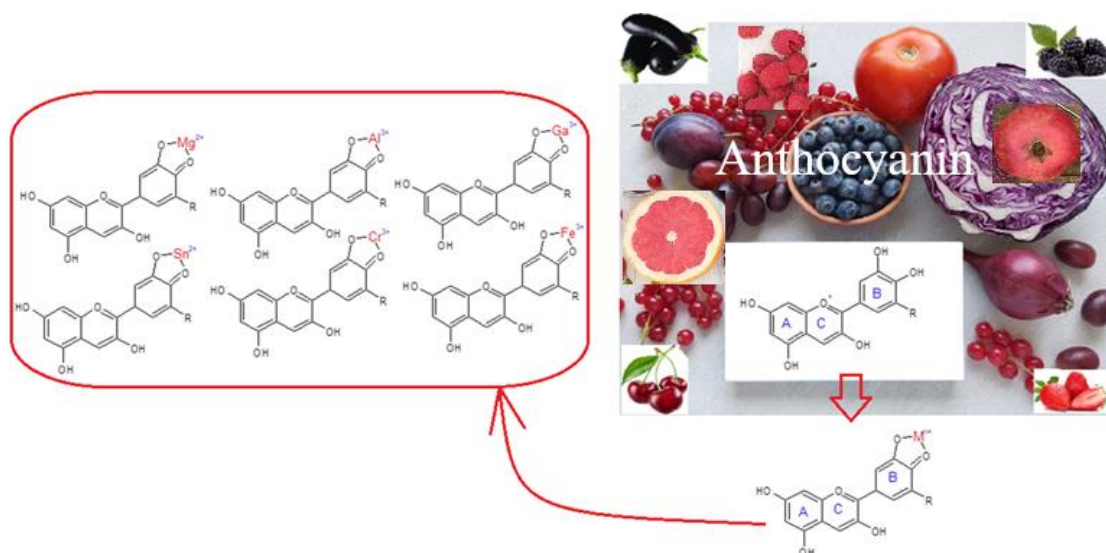


Fig. 1. Linkage of Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^3 to anthocyanins.

Antioxidants are extremely valuable food ingredients for our health as they fight against the famous free radicals, responsible for oxidative stress [33–35]. For example, the chelation of Al^{3+} by anthocyanins was more investigated owing to its dependence with the blue coloration of hydrangea floral structures. The complexes with acceptable stability between delphinidin and aluminum were found to produce acidified ethanol and a wide range of pH [36–39]. Phenolic plant seems to have multiple mechanisms of action in combating cancer including angiogenesis denying vascular tumors required for proliferation, inhibiting DNA synthesis, inducing apoptosis, and cellular differentiation inhibiting cancer progression. Regular consumption of raspberry anthocyanins is also reported to improve cognitive brain functions, age-related degeneration of eyesight and influence cardiovascular disease [40, 41].

Applying this approach, it can be remarked these dietary structures belong to the subclass of anthocyanin, which demonstrate the main ingredients in vegetables and fruits, as rich inhibiting agents of the main protease and targeting the receptor-binding domain (RBD) of S-protein for SARS-CoV2. In addition, molecular docking assigns swift diagnosis of the amino acid sequences for SARS-CoV-2 [42–44].

2. MATERIAL AND METHODS

Herein, comprehensive computational investigations were performed to identify new lead compounds against main protease enzyme. Geometry optimization of Mg^{2+} Cya, Al^{3+} Cya, Ga^{3+} Cya, Sn^{2+} Cya, Cr^{3+} Cya, and Fe^{3+} Cya chelation complexes through their B ring in water at 300K have been calculated using Gaussian 16 revision C.01 program [45]. In addition, the properties of Bader charge and thermodynamic parameters of Mg^{2+} ACN, Al^{3+} ACN, Ga^{3+} ACN,

Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN chelation through their B ring in aqueous medium at 300K have been computed (Fig. 2 a, b, c).

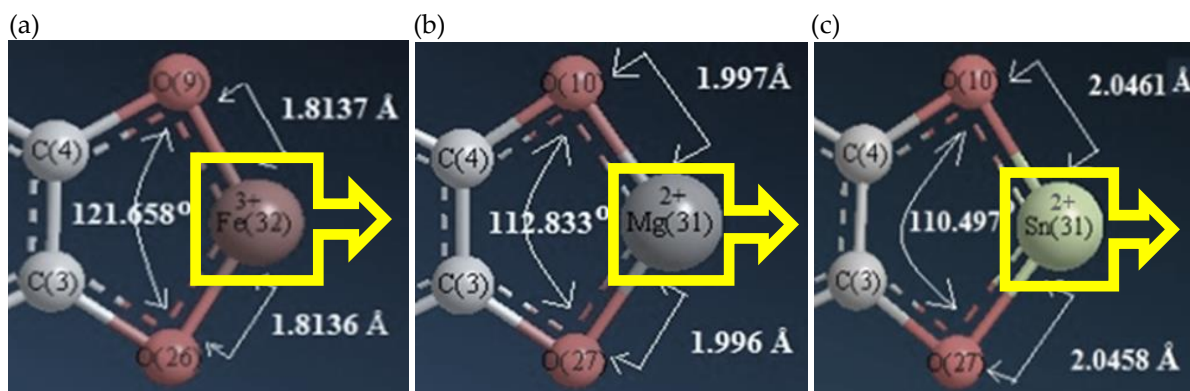


Fig. 2. Optimized structures of (a) Fe^{3+}ACN , (b) Mg^{2+}ACN , (c) Sn^{2+}ACN through remarking $\text{O} \cdots \text{M}^{n+}$ and bond angle of $\text{O} \cdots \text{M}^{n+} \cdots \text{O}$ bond lengths.

For accomplishing a stable structure of Mg^{2+}ACN , Al^{3+}ACN , Ga^{3+}ACN , Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN chelation of Mal, Peo, Del, Pet, and Cya pigments, geometry optimization plus frequency calculations were done; the frequency and intensity of the vibrational modes were calculated with the QM theoretical method, and the principal vibrational modes were analyzed by their changes of Gibbs free energy in water at 300K. The data has been achieved from thermodynamic parameters of ΔG , ΔH and ΔS for the solute-solvent model of Mg^{2+}ACN , Al^{3+}ACN , Ga^{3+}ACN , Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN chelation. Thus, geometry coordination, Bader charge and thermodynamic attributes of three Al^{3+} →anthocyanin chelation of Cy, Dp, and Pt pigments through their B ring in gas and aqueous media at 300K have been estimated in a periodic box of H_2O molecules.

The optimized geometries include the bond length of oxygen - $\text{Mg}^{2+} \approx (1.9\text{\AA})$ and the bond angle of oxygen - Mg^{2+} - oxygen $\approx (112^\circ)$ while it has been exhibited the bond length of oxygen - $\text{M}^{3+} \approx (1.8\text{\AA})$ and bond angle of oxygen - M^{3+} - oxygen $\approx (120^\circ)$ for trivalent metal ions of Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} and Fe^{3+} . Our computations have been carried out due to the conceptual DFT/B3LYP/6-31G (d,p) method using the projector-augmented-wave (PAW) methodology [46–49]. The theoretical computations have been run to attain more valid equilibrium geometrical data and infrared spectral information for each of the recognized complexes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the candidate anthocyanin-derived compounds were filtered considering antiviral characteristics of anthocyanins. The structure-based pharmacophore modeling was developed based on the co-crystallized structure of the enzyme with its biological active inhibitor [50–52]. The thermodynamic properties including ΔG , ΔH , ΔS , Electronic Energy and Core-Core for conjunction of Mal, Peo, Del, Pet, and Cya with cations of Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} in different pH have been measured using Gaussian 16 revision C.01 [45] program in aqueous medium (Table 1).

Table 1. Thermochemical specifications for Cya, Del, Mal, Pel, Peo, pet in aqueous medium at 300 K.

Pigment	$\Delta H \times 10^{-3}$ (kcal/mol)	$\Delta G \times 10^{-5}$ (kcal/mol)	$E_{\text{binding}} [53]$ (kcal/mol)	$\Delta S \times 10^{-2}$	$E_{\text{electronic}} \times 10^{-6}$ (kcal/mol)	$E_{\text{core-core}} \times 10^{-6}$ (kcal/mol)	$\ln K \times 10^{-5}$
Cya	-1.54	-2.85	-6.4	9.44	-2.80	2.51	2.85
Del	-1.57	-2.92	-6.5	9.69	-2.89	2.60	4.90
Mal	-9.07	-2.11	-6.4	7.00	-1.86	1.65	3.54
Pel	-1.26	-2.45	-6.9	8.14	-2.25	2.01	1.37
Peo	-1.42	-2.72	-6.4	9.03	-2.61	2.33	4.56
Pet	-1.47	-2.80	-	9.28	-2.75	2.47	4.69

The difference of ΔH (kcal/mol) among the chelated complexes of Mg^{2+}ACN , Al^{3+}ACN , Ga^{3+}ACN , Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN (Fig. 3) has been observed owing to double bonds and carbonyl groups through the chelation of B ring for Cya, Del and Pet anthocyanins in water that illustrates the stability and color of Mg^{2+}ACN , Al^{3+}ACN , Ga^{3+}ACN , Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN chelation of Cya, Del, and Pet pigments in a weak acidic condition. The consequences of ΔH for formation of $[\text{Mg}^{2+}, \text{Al}^{3+}, \text{Ga}^{3+}, \text{Sn}^{2+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Cya, Del, Pet}]$ chelation complexes have been shown by Fig.3 and reported data in Table 1.

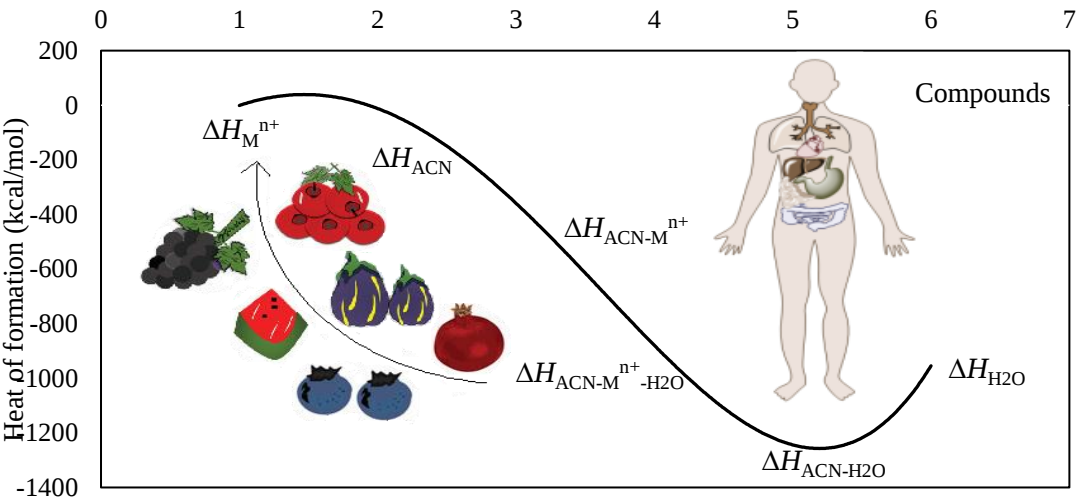


Fig. 3. Enthalpy reaction (ΔH , kcal/mol) for formation of Mg^{2+}ACN , Al^{3+}ACN , Ga^{3+}ACN , Sn^{2+}ACN , Cr^{3+}ACN , and Fe^{3+}ACN complexes.

After identifying all steps of the cation trapping reaction and the associated energy features, the overall Gibbs free energy profile was analyzed and shown in Table 1. The reactions in protons had to be fitted due to computational difficulty on the dissolution free energy of the proton. The effect of metal ions of Mg^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Sn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} joined to anthocyanins, which was modeled as an aqueous food system, was illustrated using thermodynamic computation. The equilibrium constant and free energy of the binding reaction between anthocyanins and stabilizers were theoretically important. The change in free energy change (ΔG) may be the best indicator of the protection offered by dietary stabilizers on anthocyanins, which was demonstrated the best stabilizer among dietary compounds as Del with $\Delta G = -2.92 \times 10^{-5}$ kcal/mol (Table 1).

Recently, it was evaluated the ability of eighteen compounds derived from anthocyanin for the inhibition of the main protease (6lu7) and the receptor-binding domain of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 [53]. Cyanidin-3-arabinoxide exhibited significant binding stability and interaction, with key residues within the binding site of coronavirus main protease (6lu7). According to their study, the ligand cyanidin-3-arabinoxide, which shows potential inhibition of SARS-CoV-2 *in silico*, was observed in high concentration in *black chokeberries*, *bilberries*, *lingonberries*, *gooseberries*, *rubus*, *blackcurrants*, while pelargonidin-3-glucoside found in *raspberry* and *strawberry*. Therefore, they can prevent virus infection. Depending on the docking scores and binding energies, Cyanidin-3-arabinoxide exhibits docking scores of -7.5 and -5.5 kcal/mol, so it is a potential inhibitor for SARS-CoV-2. Considering the achieved results, regular consumption of berry fruits can inhibit and control COVID-19 disease by suppression of propagation and pathogenicity of SARS-CoV-2 [53].

The absorbance (A) of chelated cations including Mg^{2+} , Ga^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , and Al^{3+} with Cya, Del, and Pet pigments in aqueous periodic box has been calculated through the beer-lambert law which is related to the concentration (c / mol/L) of H^+ (Table 2). The data have been shown based on equation of $A = \log_{10} (I_0/I) = \epsilon lc$, where A is the absorbance; I , intensity of current; ϵ , molar absorptivity coefficient and c , concentration of solution (Table 2).

Table 2. Measured absorbance (A), Frequency and Dipole moment of metal $\rightarrow$ anthocyanin chelation of Cya, Del, and Pet in various pH

pH	A	Frequency	Dipole	A	Frequency	Dipole	A	Frequency	Dipole	A	Frequency	Dipole	A	Frequency	Dipole
Cya	$Mg^{2+} \times 10^{-3}$			$Ga^{3+} \times 10^{-3}$			$Cr^{3+} \times 10^{-3}$			$Fe^{3+} \times 10^{-3}$			$Al^{3+} \times 10^{-3}$		
1.17	0.10	3.922	3.05	0.25	3.925	18.65	0.22	3.926	9.94	0.13	3.925	0.25	0.25	3.924	18.65
1.30	1.20	3.927	3.24	1.32	3.925	16.74	0.96	3.931	8.39	1.06	3.926	1.32	1.32	3.925	16.74
1.40	1.21	3.927	1.53	0.64	3.926	16.35	0.65	3.926	10.31	0.95	3.926	0.64	0.64	3.926	16.35
1.48	1.89	4.014	5.27	1.87	4.008	13.82	0.68	3.926	8.59	1.19	3.928	1.87	1.87	4.008	13.82
1.54	1.89	4.012	3.91	1.85	4.007	6.69	1.90	4.009	9.59	1.90	4.012	1.85	1.85	4.007	6.69
Del	$Mg^{2+} \times 10^{-3}$			$Ga^{3+} \times 10^{-3}$			$Cr^{3+} \times 10^{-3}$			$Fe^{3+} \times 10^{-3}$			$Al^{3+} \times 10^{-3}$		
pH	$Mg^{2+} \times 10^{-3}$			$Ga^{3+} \times 10^{-3}$			$Cr^{3+} \times 10^{-3}$			$Fe^{3+} \times 10^{-3}$			$Al^{3+} \times 10^{-3}$		
1.17	0.70	3.926	6.71	0.42	3.925	18.78	0.89	3.933	9.04	0.89	3.767	7.90	3.59	3.925	16.19
1.30	1.20	3.929	3.67	1.25	3.927	14.94	0.89	3.933	9.04	0.93	3.945	7.47	1.07	3.929	17.15
1.40	2.81	5.816	2.60	1.24	3.928	12.99	1.07	3.935	6.40	0.89	3.928	6.87	1.12	3.929	16.10
1.48	1.24	3.930	4.91	3.75	4.041	15.99	1.92	4.018	7.38	1.92	4.018	5.54	1.86	4.015	17.01
1.54	1.92	4.018	3.75	1.90	4.014	13.14	1.84	4.015	9.03	1.95	4.016	6.38	1.80	4.013	16.86
Pet	$Mg^{2+} \times 10^{-3}$			$Ga^{3+} \times 10^{-3}$			$Cr^{3+} \times 10^{-3}$			$Fe^{3+} \times 10^{-3}$			$Al^{3+} \times 10^{-3}$		
pH	$Mg^{2+} \times 10^{-3}$			$Ga^{3+} \times 10^{-3}$			$Cr^{3+} \times 10^{-3}$			$Fe^{3+} \times 10^{-3}$			$Al^{3+} \times 10^{-3}$		
1.2	0.39	3.925	8.2	0.61	3.926	17.77	1.47	3.767	26.67	0.39	3.925	8.2	1.22	3.764	17.84
1.30	3.59	3.925	7.89	0.57	3.926	16.37	0.27	3.926	9.77	3.59	3.925	7.89	3.59	3.930	16.22
1.40	0.97	3.938	6.59	1.04	3.936	15.78	1.02	3.945	9.34	0.97	3.938	6.59	8.50	7.744	19.27
1.48	0.96	3.941	5.34	1.07	3.935	17.38	0.86	3.940	6.89	0.96	3.941	5.34	1.06	3.954	16.27
1.54	1.00	3.940	6.52	1.89	4.014	12.82	0.92	3.943	6.21	1.00	3.941	6.52	1.96	4.013	15.92

The reduction in absorbance might be related to reduced solubility of $M^{n+} \rightarrow ACN$ complexes which eventuate in precipitation of some complexes. The large increments in absorbance might be treated to convert as the colorless forms of ACN to those which absorb and reflect visible light as well as the M^{n+} induced linked to ACN compounds (Fig. 4 a,b). Furthermore,

the complexes of Ga^{3+}Pet , Cr^{3+}Pet , Mg^{2+}Pet (Fig. 4a) and Al^{3+}Cya , Ga^{3+}Cya , Mg^{2+}Cya (Fig. 4b) have indicated the maximum absorbance in the low concentration.

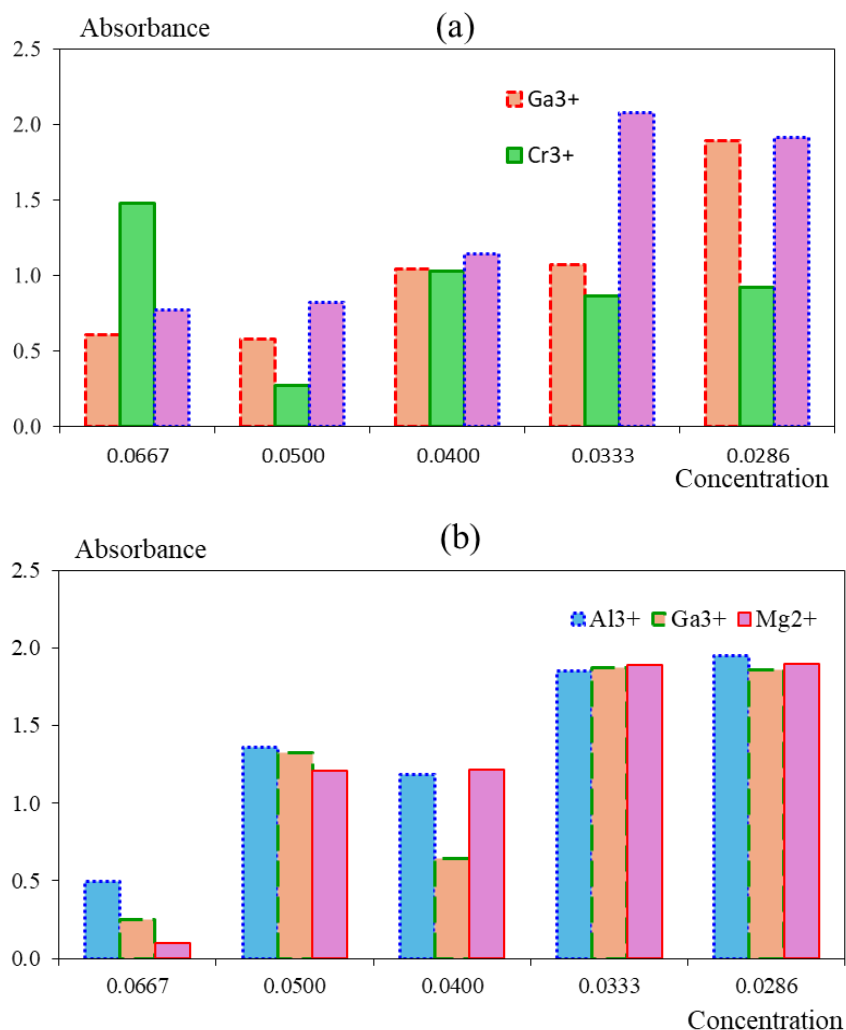


Fig. 4. The graphs of Absorbance versus concentration for complexes of (a) Ga^{3+}Pet , Cr^{3+}Pet , Mg^{2+}Pet and (b) Al^{3+}Cya , Ga^{3+}Cya , Mg^{2+}Cya complexes.

In all pH, the frequency, intensity, absorbance, and thermodynamics specifications of ACN-chelation were found to be significantly different with each metal treatment (Al^{3+} , Ga^{3+} , Mg^{2+}). In calculations, Al^{3+} was identified to displace Mg^{2+} in Mg^{2+}ACN complexes, Cya based and produces more stable complexes (Table 2). The nucleophilic index and dipole moment in different pH were applied to quantify van der Waals interaction between anthocyanins and stabilizers. It has been seen that by increasing the pH, the frequency of Al^{3+}Cya , Ga^{3+}Cya , Mg^{2+}Cya complexes increase between pH ≈ 1.1 -1.5. The maximum frequency for Al^{3+}Cya , Ga^{3+}Cya , Mg^{2+}Cya complexes is in the pH between 1.50 to 1.55 of weak acidic medium (Table 2). The frequency vibrational modes were indicated based on the stability and color of different cations $\rightarrow$ anthocyanin chelation (Table 2). Then, the Bader charge of indicated atoms in Mg^{2+}ACN , Ga^{3+}ACN , Cr^{3+}ACN , Fe^{3+}ACN , and Al^{3+}ACN chelation has been measured as the active zones of the structures which represent a significant function for the electron charge transfer towards generating a range of different colors in aqueous medium (Table 3).

Table 3. Bader charge for some particles of Mg^{2+} ACN, Ga^{3+} ACN, Cr^{3+} ACN, Fe^{3+} ACN, and Al^{3+} ACN in aqueous medium.

Cyanidin					
atom	Mg^{2+}	Ga^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}
O (10)	-0.42	-0.37	-0.02	-0.16	-0.36
O ⁺ (17)	-0.13	-0.16	-0.13	-0.14	-0.13
O (24)	-0.20	-0.23	-0.21	-0.21	-0.18
O (25)	-0.22	-0.22	-0.21	-0.22	-0.21
O (26)	-0.21	-0.21	-0.21	-0.21	-0.21
O (27)	-0.39	-0.34	-0.07	-0.13	-0.33
$\text{M}^{\text{nt}}(31)$	0.76	0.76	0.45	0.07	0.02
Delphinidin					
atom	Mg^{2+}	Ga^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}
O (9)	-0.39	-0.56	0.0	-0.14	-0.32
O ⁺ (16)	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13
O (23)	-0.20	-0.18	-0.21	-0.20	-0.18
O (24)	-0.21	-0.20	-0.20	-0.21	-0.20
O (25)	-0.21	-0.21	-0.21	-0.21	-0.21
O (26)	-0.40	-0.63	-0.06	-0.12	-0.33
O (30)	-0.21	-0.18	-0.21	-0.21	-0.19
$\text{M}^{\text{nt}}(32)$	0.76	0.64	0.42	0.04	0.04
Petunidin					
atom	Mg^{2+}	Ga^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}
O ⁺ (7)	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13
O (17)	-0.40	-0.57	-0.03	-0.13	-0.33
O (18)	-0.39	-0.63	-0.04	-0.17	-0.33
O (19)	-0.20	-0.19	-0.21	-0.21	-0.19
O (20)	-0.21	-0.19	-0.21	-0.20	-0.21
O (21)	-0.22	-0.21	-0.22	-0.22	-0.21
O (30)	-0.15	-0.12	-0.15	-0.15	-0.13
$\text{M}^{\text{nt}}(35)$	0.76	0.65	0.42	0.0	0.03

The IR vibrational frequencies have shown that the normal mode of the active zones owing to cations→anthocyanin chelation of Al^{3+} Cya, Al^{3+} Del, and Al^{3+} Pet in optimized weak acidic media affirms the stability and color of these compounds. The alteration of Bader charge for functionalized atoms through optimized complexes of Mg^{2+} ACN, Al^{3+} ACN, Ga^{3+} ACN, Sn^{2+} ACN, Cr^{3+} ACN, and Fe^{3+} ACN have been plotted in Fig. 5(a, b).

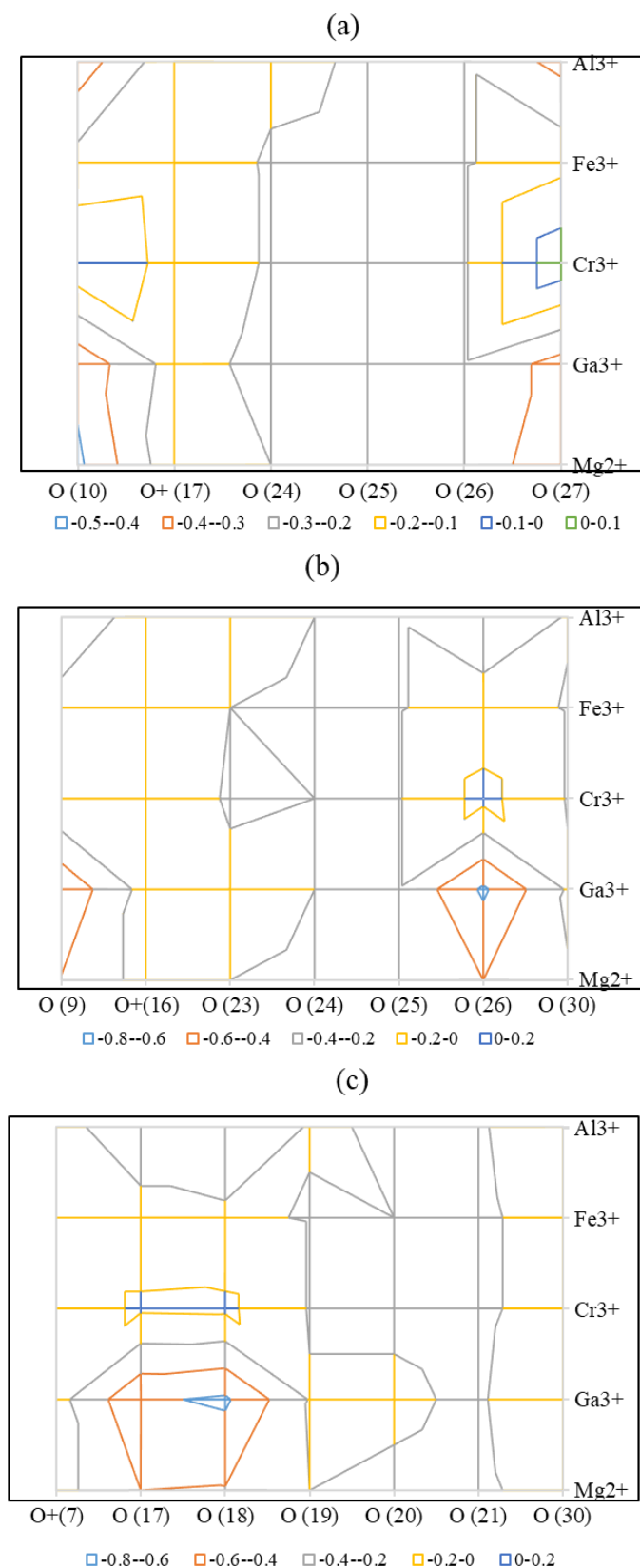


Fig. 5. Atomic orbital electron population for some atoms through optimized Mg²⁺ ACN, Al³⁺ ACN, Ga³⁺ ACN, Sn²⁺ ACN, Cr³⁺ ACN, and Fe³⁺ ACN chelation in aqueous medium.

As a matter of fact, the partial charges and spin density have been gained by matching the electrostatic potential to atomic charge of O⁺₁₇, O⁺₁₆, and O⁺₇ ions for Mⁿ⁺(31)Cya, Mⁿ⁺(32)Del

and $M^{n+}(35)Pet$, respectively (Table 3 & Fig. 5a,b). Thus, the electrophilic groups of Cya, Del anthocyanin pigments lead us to explore the cause for the activity and the stability of these compounds in natural products. The perspective of Fig. 5(a,b) suggests the cause for observing a variety of consequences for chelated complexes of $Mg^{2+}ACN$, $Al^{3+}ACN$, $Ga^{3+}ACN$, $Sn^{2+}ACN$, $Cr^{3+}ACN$, and $Fe^{3+}ACN$ which are attached to the location of active zones of functionalized oxygen atoms and cations in these structures due to charge transferring in aromatic cyclic chain.

CONCLUSIONS

The receptor–ligand complexes of the lead compounds were analyzed, and a hypothesis was generated using the phase interface of DFT method to highlight the major properties that actively contribute to the characteristic binding of the lead ligands to the active sites of the target proteins. This study evaluates the ability of these compounds for inhibiting the main protease and the receptor–binding domain of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 through molecular modeling simulation. Applying beer-lambert proof on chelated complexes of $Mg^{2+}ACN$, $Al^{3+}ACN$, $Ga^{3+}ACN$, $Sn^{2+}ACN$, $Cr^{3+}ACN$, and $Fe^{3+}ACN$ using theoretical approaches indicates absorbance factor in gas and aqueous media and then explores the stabilization energy, thermodynamic specifications and the electronic structural of optimized cluster chelated of $Mg^{2+}ACN$, $Al^{3+}ACN$, $Ga^{3+}ACN$, $Sn^{2+}ACN$, $Cr^{3+}ACN$, and $Fe^{3+}ACN$. In addition, it has been discovered that $[Mg^{2+}, Al^{3+}, Ga^{3+}, Sn^{2+}, Cr^{3+} \text{ and } Fe^{3+} \rightarrow \text{anthocyanin}]$ cluster chelation is related to the axes of active areas of functionalized oxygen atoms and cations in these complexes which alter the electronic charges in aromatic cyclic chains because of aqueous dielectric constant compared to gas medium. Regarding the received results, regular consumption of some vegetables and fruits could be useful to monitor and inhibit COVID-19 disease by suppression of propagation and pathogenicity of SARS-CoV-2.

ACKNOWLEDGMENTS

In successfully completing this paper and its research, the authors are grateful to Kastamonu University.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. L. Alomair, S. Mustafa, M.S. Jafri, W. Alharbi, A. Aljouie, F. Almsned M. Alawad, Y.A. Bokhari & M. Rashid. Molecular dynamics simulations to decipher the role of phosphorylation of SARS-CoV-2 nonstructural proteins (nsps) in viral replication. *Viruses*, **14**(11), 2436 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/v14112436>
2. M.A.A. Zadeh, H. Lari, L. Kharghanian, E. Balali, R. Khadivi, H. Yahyaei, F. Mollaamin & M. Monajjemi. Density functional theory study and anti-cancer properties of Shyshaq plant: In view point of nano biotechnology. *J. Comput. Theoret. Nanosci.*, **12**(11), 4358-4367 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2015.4366>
3. M. Monajjemi, S. Afsharnezhad, M.R. Jaafari, S. Mirdamadi, F. Mollaamin & H. Monajjemi. Investigation of energy and NMR isotropic shift on the internal rotation Barrier of Θ_4 dihedral angle of the DLPC: A GIAO study. *Chemistry*, **17**(1), 55–69 (2008).

4. M. Monajjemi, F. Mollaamin & S. Shojaei. An overview on coronaviruses family from past to COVID-19: Introduce some inhibitors as antiviruses from Gillan's plants. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **10**(3), 5575–5585 (2020). Doi: <https://doi.org/10.33263/briac103.575585>
5. S. Shahriari, M. Monajjemi & F. Mollaamin. Determination of proteins specification with SARS-Covid-19 based ligand designing. *J. Chil. Chem. Soc.*, **67**(2), 5468–5476 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072022000205468>
6. A. Majeed & X. Zhang. On the adoption of modern technologies to fight the COVID-19 pandemic: A technical synthesis of latest developments. *COVID*, **3**(1), 90–123 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/covid3010006>
7. F. Mollaamin. Conocimiento de enfermedades virales terapéuticas: aplicación de SWCNT en la administración de fármacos. *Rev. Colomb. Quím.*, **52**(2), 28–35 (2024). Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n2.111888>
8. F. Mollaamin. Characterizing the structural and physicochemical properties of medicinal plants as a proposal for treating of viral malady. *Trends Immunother.*, **7**(2), 2329 (2023). Doi: <https://doi.org/10.24294/ti.v7.i2.2329>
9. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Thermodynamic research on the inhibitors of coronavirus through drug delivery method. *J. Chil. Chem. Soc.*, **66**(2), 5195–5205 (2021). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072021000205195>
10. A. Tahan, F. Mollaamin & M. Monajjemi. Thermochemistry and NBO analysis of peptide bond: Investigation of basis sets and binding energy. *Russ. J. Phys. Chem. A*, **83**(4), 587–597 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1134/S003602440904013X>
11. F. Mollaamin. Structural and functional characterization of medicinal plants as selective antibodies towards therapy of COVID-19 symptoms. *Antibodies*, **13**(2), 38 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/antib13020038>
12. F. Zeng, Y. Huang, Y. Guo, M. Yin, X. Chen, L. Xiao & G. Deng. Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: A meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, **96**, 467–474 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.055>
13. F. Mollaamin. Physicochemical investigation of anti-covid19 drugs using several medicinal plants. *J. Chil. Chem. Soc.*, **67**(2), 5537–5546 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072022000205537>
14. Q.M.S. Jamal. Antiviral potential of plants against COVID-19 during outbreaks—An update. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(21), 13564 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms232113564>
15. J. Remali & W.M. Aizat. A review on plant bioactive compounds and their modes of action against coronavirus infection. *Front. Pharmacol.*, **11**, 589044 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.589044>
16. F. Mollaamin, S. Shahriari & M. Monajjemi. Monkeypox disease treatment by tecovirimat adsorbed onto single-walled carbon nanotube through drug delivery method. *J. Chil. Chem. Soc.*, **68**(1), 5796–5801 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072023000105796>
17. T. Capell, R.M. Twyman, V. Armario-Najera, J.K.-C. Ma, S. Schillberg & P. Christou. Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci.*, **25**(7), 635–643 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
18. F. Mollaamin & M. Monajjemi. B₅N₁₀ Nanocarrier functionalized with Al, C, Si atoms: A drug delivery method for infectious disease remedy. *OBM Genetics*, **08**(01), 214 (2024). Doi: <https://doi.org/10.21926/obm.genet.2401214>
19. S. Murugesan, C. Ragavendran, A. Ali, V. Arumugam, D.K. Lakshmanan, P. Palanichamy, *et al.* Screening and druggability analysis of marine active metabolites against SARS-CoV-2: An integrative computational approach. *Int. J. Transl. Med.*, **3**(1), 27–41 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijtm3010003>
20. M.L. Castro-Acosta, G.N. Lenihan-Geels, C.P. Corpe & W.L. Hall. Berries and anthocyanins: promising functional food ingredients with postprandial glycaemia-lowering effects. *Proc. Nutr. Soc.*, **75**(3), 342–355 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1017/s0029665116000240>
21. O. Paredes-López, M.L. Cervantes-Ceja, M. Vigna-Pérez & T. Hernández-Pérez. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life—A review. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **65**(3), 299–308 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1>

22. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Drug delivery using doping of boron nitride nanosensor towards releasing chloroquine drug in the cells: A promising method for overcoming viral disease. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **53**(2), 430–454 (2024). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciq-uifa.v53n2.114450>
23. P.H.M. Torres, A.C.R. Sodero, P. Jofily & F.P. Silva, Jr. Key topics in molecular docking for drug design. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(18), 4574 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>
24. S. Das, S. Sarmah, S. Lyndem & A.S. Roy. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**(9), 3347–3357 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201>
25. M. Monajjemi, A. Sobhanmanesh & F. Mollaamin. Theoretical studies of solvent effects on binding of $\text{Sn}(\text{CH}_3)_2(\text{N-acetyl-L-cysteinate})$ with single-walled carbon nanotube. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.*, **21**(1), 47–63 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1080/1536383X.2011.574325>
26. P.T. Mpiana, K.t.N. Ngbolua, D.S.T. Tshibangu, J.T. Kilembe, B.Z. Gbolo, D.T. Mwanangombo, C.L. Inkoto, E.M. Lengbiye, C.M. Mbadiko, A. Matondo, G.N. Bongo & D.D. Tshilanda. Identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease from Aloe vera compounds: A molecular docking study. *Chem. Phys. Lett.*, **754**, 137751 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.137751>
27. B. Khalili-Hadad, F. Mollaamin & M. Monajjemi. Biophysical chemistry of macrocycles for drug delivery: a theoretical study. *Russ. Chem. Bull.*, **60**(2), 238–241 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-011-0039-5>
28. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Thermodynamic research on the inhibitors of coronavirus through drug delivery method. *J. Chil. Chem. Soc.*, **66**(2), 5195–5205 (2021). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072021000205195>
29. S. Mazzini, L. Musso, S. Dallavalle & R. Artalli. Putative SARS-CoV-2 Mpro inhibitors from an in-house library of natural and nature-inspired products: A virtual screening and molecular docking study. *Molecules*, **25**(16), 3745 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25163745>
30. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Molecular drug discovery of potential inhibitor of Covid–19 using several medicinal plant ingredients: A promising therapy for viral disease. *Rev. Fac. Cienc.*, **13**(1), 141–158 (2024). doi: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v13n1.111288>
31. M. Alfaro, I. Alfaro & C. Angel. Identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 papain-like protease from tropane alkaloids from *Schizanthus porrigens*: A molecular docking study. *Chem. Phys. Lett.*, **761**, 138068 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.138068>
32. F. Mollaamin. Computational methods in the drug delivery of carbon nanocarriers onto several compounds in Sarraceniaceae medicinal plant as monkeypox therapy. *Computation*, **11**(4), 84 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/computation11040084>
33. M.E. Olsson, K.E. Gustavsson, S. Andersson, Å. Nilsson & R.-D. Duan. Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J. Agricul. Food Chem.*, **52**(24), 7264–7271 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1021/jf030479p>
34. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Application of DFT/TD-DFT frameworks in the drug delivery mechanism: Investigation of chelated bisphosphonate with transition metal cations in bone treatment. *Chemistry*, **5**(1), 365–380 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/chemistry5010027>
35. B. Ghalandari, M. Monajjemi & F. Mollaamin. Theoretical investigation of carbon nanotube binding to DNA in view of drug delivery. *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **8**(7), 1212–1219 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1801>
36. F. Mollaamin, S. Shahriari & M. Monajjemi. Treating omicron BA.4 & BA.5 via herbal antioxidant asafoetida: A DFT study of carbon nanocarrier in drug delivery. *J. Chil. Chem. Soc.*, **68**(1), 5781–5786 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072023000105781>
37. E.M. Sarasia, S. Afsharnezhad, B. Honarparvar, F. Mollaamin & M. Monajjemi. Theoretical study of solvent effect on NMR shielding tensors of luciferin derivatives. *Phys. Chem. Liq.*, **49**(5), 561–571 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319101003698992>
38. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Determination of SWCNT biosensor for bisphosphonate–2X (X = Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) delivery in bone cell through electromagnetic and thermodynamic analysis using QM/MC methods. *Sensor Rev.*, **44**(2), 100–112 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1108/SR-05-2023-0148>

39. M. Monajjemi, H. Yamola & F. Mollaamin. Study of bio-nano interaction outlook of amino acids on single-walled carbon nanotubes. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.*, **22**(6), 595–603 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1080/1536383X.2012.702163>
40. H.D. Schreiber, A.M. Swink & T.D. Godsey. The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. *J. Inorg. Biochem.*, **104**(7), 732–739 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006>
41. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Carbon nanotubes as biosensors for releasing conjugated bisphosphonates–metal ions in bone tissue: Targeted drug delivery through the DFT Method. *C J. Carbon Res.*, **9**(2), 61 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/c9020061>
42. F. Mollaamin, S. Shahriari & M. Monajjemi. Therapeutic role of medicinal plants against viral diseases focusing on COVID-19: Application of computational chemistry towards drug design. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **53**(1), 19–43 (2024). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112978>
43. K.N. Chitralla, X. Yang, B. Busbee, N.P. Singh, L. Bonati, Y. Xing, P. Nagarkatti & M. Nagarkatti. Computational prediction and in vitro validation of VEGFR1 as a novel protein target for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Sci. Reports*, **9**(1), 6810 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43232-4>
44. F. Mollaamin, S. Shahriari & M. Monajjemi. Drug design of medicinal plants as a treatment of Omicron variant (Covid-19 variant B.1.1.529). *J. Chil. Chem. Soc.*, **67**(3), 5562–5570 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072022000305562>
45. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, *et al.* Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
46. 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>
47. J.P. Perdew, M. Ernzerhof & K. Burke. Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations. *J. Chem. Phys.*, **105**(22), 9982–9985 (1996). Doi: <https://doi.org/10.1063/1.472933>
48. F. Mollaamin & M. Monajjemi. Molecular modelling framework of metal-organic clusters for conserving surfaces: Langmuir sorption through the TD-DFT/ONIOM approach. *Mol. Simulat.*, **49**(4), 365–376 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1080/08927022.2022.2159996>
49. K. Bakhshi, F. Mollaamin & M. Monajjemi. Exchange and correlation effect of hydrogen chemisorption on nano V(100) surface: A DFT study by Generalized Gradient Approximation (GGA). *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **8**, 763–768 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1750>
50. D. Marko, N. Puppel, Z. Tjaden, S. Jakobs & G. Pahlke. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**(4), 318–325 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400034>
51. N. Katsube, K. Iwashita, T. Tsushida, K. Yamaki & M. Kobori. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agricult. Food Chem.*, **51**(1), 68–75 (2002). Doi: <https://doi.org/10.1021/jf025781x>
52. S. Zafra-Stone, T. Yasmin, M. Bagchi, A. Chatterjee, J.A. Vinson & D. Bagchi. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**(6), 675–683 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>
53. O. Messaoudi, H. Gouzi, A.N. El-Hoshoudy, F. Benaceur, C. Patel, D. Goswami, D. Boukerouis & M. Bendahou. Berries anthocyanins as potential SARS-CoV-2 inhibitors targeting the viral attachment and replication; molecular docking simulation. *Egypt. J. Petroleum*, **30**(1), 33–43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2021.01.001>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

F. Mollaamin & M. Monajjemi. Antiviral effect of anthocyanins in vegetables and fruits against viral diseases: Insight to medication design by computational chemistry approaches. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **54**(1), 218–230 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119556>

Solid self-emulsifying dosage forms for carrying Amphotericin B: A preformulation study

Francisco Alexandrino-Jr^{1a,*}, Michelle A. Sarcinelli^{1b}, Gabriel Barcellos^{1,2c}, Leny A. H. Nascimento^{1d}, Thalita M. Silva^{1,2e}, Katty G. H. Silva^{3f}, Livia D. Prado^{1g}, Helvécio V. A. Rocha^{1,2h} & Beatriz F. C. Patricio⁴ⁱ

¹ Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN), VPPIS, Fundação de Oswaldo Cruz (Fiocruz), 21040361, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Pesquisa Translacional em Fármacos e Medicamentos, Farmanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 21941902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴ Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), 20211005, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. beatriz.patricio@unirio.br

*Corresponding author E-mail: alexandrino_jr@yahoo.com.br or francisco.alexandrino@fiocruz.br

ORCID IDs and E-mail addresses:

^a <https://orcid.org/0000-0002-1173-9164> alexandrino_jr@yahoo.com.br

^b <https://orcid.org/0000-0002-2364-9270> malvaressarcinelli@gmail.com

^c <https://orcid.org/0000-0002-3060-1355> briel08@gmail.com

^d <https://orcid.org/0000-0003-4703-6361> leny.anhenrique@gmail.com

^e <https://orcid.org/0000-0002-5691-9900> liviaderis@gmail.com

^f <https://orcid.org/0000-0001-7685-3120> thalitamartins.far@gmail.com

^g <https://orcid.org/0000-0002-8750-1726> holanda.gyselle@gmail.com

^h <https://orcid.org/0000-0002-9624-6405> helvecio.rocha@fiocruz.br

ⁱ <https://orcid.org/0000-0002-2477-9798> beatriz.patricio@unirio.br

Received: August 1, 2024

Corrected: January 31, 2025

Accepted: February 6, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119557>

SUMMARY

Introduction: Amphotericin B (AmB) is a macrolide derived from *Streptomyces nodosus* used to treat fungal infections and leishmaniasis. Its main clinical limitation is associated with severe nephrotoxicity after iv administration. **Aim:** Therefore, this study aimed to develop and characterize AmB-loaded solid self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for oral administration. **Methodology:** to reach this goal, first an extensive solubility test was performed on 45 excipients, followed by a pseudo-ternary phase diagram to understand the phase behavior after mixing the chosen excipients with intestinal biorelevant media. Thereafter, solid SEDDS were produced either by filling hard capsules with SEDDS (LFC) or by adsorbing them onto solid excipients to formulate tablets and granules. **Results:** Phosal 50 PG presented the highest AmB solubility, and based on the phase behavior, two formulations with different oil-surfactant proportions were selected. The nitrogen adsorption method indicated that solid excipients incorporated the SEDDS, and no significant difference between these two formulations was

found regarding droplet size, PDI, and AmB concentration. **Conclusions:** the LFC revealed to be the most promising dosage form, not only carrying the highest drug load, but also displaying an average size assigned as the ideal range for intestinal absorption. Therefore, supporting further *in vivo* studies to evaluate its therapeutic potential.

Keywords: Leishmaniasis; Fungal infections; Solubility; Solid SEDDS; Biorelevant media.

RESUMEN

Formulaciones autoemulsionantes sólidas conteniendo Anfotericina B: Un estudio de preformulación

Introducción: La Anfotericina B (AmB) es un macrólido derivado de *Streptomyces nodosus* utilizado para tratar infecciones fúngicas y leishmaniasis. Su principal limitación clínica está asociada con una nefrotoxicidad severa después de la administración intravenosa. **Objetivo:** Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar sistemas de administración de medicamentos autoemulsionantes sólidos (SEDDS) cargados con AmB para administración oral. **Metodología:** Para alcanzar este objetivo, primero se realizó una prueba de solubilidad extensa en 45 excipientes, seguida de un diagrama de fase pseudo-ternaria para entender el comportamiento de fase después de mezclar los excipientes elegidos con medios biorelevantes intestinales. Posteriormente, los SEDDS sólidos fueron desarrollados sea llenando cápsulas duras con SEDDS (LFC) o incorporándolos en excipientes sólidos para formular comprimidos y gránulos. **Resultados:** Phosal 50 PG presentó la mayor solubilidad de AmB y, basado en el comportamiento de fase, se seleccionaron dos formulaciones con diferentes proporciones de aceite y surfactante. El método de adsorción de nitrógeno indicó que los excipientes sólidos incorporaron los SEDDS, y no se encontró una diferencia significativa entre estas dos formulaciones en cuanto al tamaño de las gotas, PDI y concentración de AmB. **Conclusiones:** El LFC demostró ser la forma farmacéutica prometedora, no solo llevando la mayor carga de medicamento, sino también mostrando un tamaño promedio como el rango ideal para la absorción intestinal. Por lo tanto, corroborando la realización de estudios *in vivo* para evaluar su potencial terapéutico.

Palabras clave: Leishmaniasis; Infecciones fúngicas; Solubilidad; SEDDS sólidos; Medios biorelevantes.

RESUMO

Formulações sólidas autoemulsionantes contendo anfotericina B: um estudo de pré-formulação

Introdução: A Anfotericina B (AmB) é um macrolídeo, derivado de *Streptomyces nodosus*, usado para tratar infecções fúngicas e leishmaniose. Sua principal limitação clínica está associada à nefrotoxicidade severa após a administração intravenosa. **Objetivo:** Portanto, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas autoemulsionantes sólidos (SEDDS) contendo AmB para administração oral. **Metodologia:** Primeiramente foi realizado um extenso teste de solubilidade em 45 excipientes, seguido por um diagrama de fase pseudo-ternário para entender o comportamento de fase após a mistura dos excipientes escolhidos com meios biorelevantes intestinais. Posteriormente, os SEDDS sólidos foram produzidos preenchendo cápsulas duras com SEDDS (CL) ou adsorvendo-os em excipientes sólidos para formular comprimidos e grânulos. **Resultados:** a maior solubilidade da AmB foi encontrada no Phosal 50 PG. Com base no comportamento de fase, duas formulações com diferentes proporções de óleo-surfactante foram selecionadas. O método de adsorção de nitrogênio indicou que os excipientes sólidos incorporaram os SEDDS, e não foi encontrada diferença significativa entre essas duas formulações em relação ao tamanho das gotículas, PDI e concentração de AmB. **Conclusões:** as CL revelaram ser a forma farmacêutica mais promissora, não apenas carregando a maior quantidade de AmB, mas também exibindo um tamanho médio considerado como a faixa ideal para a absorção

intestinal. Portanto, corroborando com a realização de estudos *in vivo* para avaliar seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: Leishmaniose; Infecções fúngicas; Solubilidade; SEDDS sólidos; Meios biorelevantes.

1. INTRODUCTION

Amphotericin B (AmB) is a polyene macrolide derived from the actinomycete *Streptomyces nodosus*. Due to its attractive characteristics for clinical use, *e.g.*, potent antifungal activity, a relatively broad spectrum of action, and low resistance rate, this molecule is currently one of the main therapeutic agents to treat life-threatening fungal infections and leishmaniasis [1, 2]. Moreover, it is also present in the Essential Medicines List (EML) of the World Health Organization (WHO). Therefore, been considered an essential item to the promotion of primary health care [3].

In contrast, numerous studies have ascribed AmB to significant toxic side effects, with nephrotoxicity being one of the most severe [4]. Such an injurious effect is, in part, related to a direct toxic effect of AmB over the renal tubular cells [5]. Moreover, it is noteworthy to mention that AmB physicochemical properties have not only been assigned as a cause to its aggregation state in an aqueous medium, which has been associated with its *in vivo* toxicity [6], but also, as the main hindrance to its use through the oral route [7], *i.e.*, the simultaneous amphiphilic and amphoteric character, due to the polyene chain and the polyol; and the presence of a free carboxyl group and an amino group respectively, confers to AmB low aqueous solubility [7] and low oral permeability [8] (it violates 3 of the 5 Lipinski's rule [7, 9]), characterizing it as class IV in the Biopharmaceutical Classification System [10, 11]. These factors promote low oral bioavailability, limiting its clinical use to intravenous administration [12].

A strategy to overcome such drawbacks and provide an outpatient treatment would be developing an oral formulation with features that surpass these troublesome physicochemical properties of AmB. Several drug delivery systems have diligently been developed to reach this goal, among them lipid systems [2, 7, 13] such as self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS), which consist of a mixture of oil, surfactant, and co-surfactant, able to spontaneously form oil-in-water (o/w) emulsions when dispersed in the aqueous media under mild homogenization [14]. These systems are extensively applied to solubilize poorly water-soluble drugs and increase their oral bioavailability due to the enhanced permeation caused by surfactant presence [15, 16]. Usually, the approach applied to obtain SEDDS involves solubilization of drugs in oil and their blending with suitable solubilizing agents⁷. The use of SEDDS as a liquid dosage form potentially displays limitations regarding the dosage inaccuracy, high production costs, as well as drug instability [17]. That is one of the main reasons the currently commercialized systems consist of soft or hard capsules filled with the lipid formulation, allowing the administration as unit doses [18]. However, this approach presents significant limitations related to the development of a capsule liquid-filled dosage form, namely, problematic filling with high viscous lipid mixtures, which increases the cost of the process [19], interaction between the filling material and the capsule shell [20], therefore, restricting its concentration into the formulation and potentially decreasing the formulation efficiency. Moreover, most pharmaceutical companies do not own *in loco* facility to manufacture such capsules. Therefore, requiring outsource to the development and manufacturing activities, which might be accounted for an inconvenient business strategy [19, 20].

To avoid such drawbacks and enable a simplified manufacturing process using more cost-effective and conventional equipment, several approaches have been reported, mostly by solidifying the lipid-based system and convert it into a powder, which can be used to fill hard gelatin capsules or to produce tablets, *e.g.* (I) adsorption of the lipid formulation into solid carriers; (II) spray drying using hydrophilic or hydrophobic carriers (III) extrusion; (IV) microencapsulation using ionotropic gelation technique; (V) wet granulation; (VI) melt granulation, *etc.* [17, 18, 21].

Since these strategies are still under investigation, the role of these solidification processes on the formulation performance remains uncertain, even though it is evident they may impact not only the self-emulsification behavior but also exhibit relevant drug-excipient and excipient-excipient interactions. Therefore, the lack of understanding of these physicochemical interactions can impact properties such as manufacturability, stability, and bioavailability of a drug product [22].

The scenario mentioned above makes the development of solid SEDDS challenging in the pre-clinical phase, not just during the process of selecting the appropriate excipients but also establishing the effect of their properties on final formulation features. Therefore, the current study aimed to develop distinct solid SEEDS dosage forms as a potential AmB carrier for oral administration and perform a thorough characterization. The AmB solubility was evaluated in 45 different excipients, the self-emulsifying process was conducted in a biorelevant medium, and the drug-excipient interaction was conducted throughout the gas adsorption method.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Amphotericin B was obtained from Hangzhou Dayangchem (China) (purity 89.6 %). Phosal 50 PG (PPG), Phosal 50 SA+, and Phosal 53 MCT were obtained from Lipoid. Kolliphor HS 15, Kolliphor RH40, Kolliphor EL were kindly donated by BASF. Capmul MCM EP, Capmul MCM C8, Capmul GMO – 50, Capyrol 90, Captex 300, Captex 355, Captex 100 were given by Abitec. Transcutol HP (purity > 99.9 %), Plurol oleique, Labrasol, Labrafac Liphophile WL 1349, Peceol, Labrafac, Labrafil M 1944 CS, Lauroglycol 90, Labrafac LG were kindly supplied by Gattefossé. Crodamol GMCC-SS, Super Refined® Polysorbate 80, Glycerox 767, Super Refined® Castor oil, Super Refined® Arlasolve (purity 98.5%), Super Refined® Oleic acid (purity 86.7%), Super Refined® PEG 300, Super Refined® PEG 400 were kindly donated by Croda. Imwitor 742, Imwitor 308 (GMC), Imwitor 988, Miglyol® 812 N, Softigen 767 were provided by IOI Oleo GmbH. Dhaytan L20, Isopropyl palmitate, Dhaykol 6040 were purchased from Dhaymers. Dichloromethane (DCM) analytical grade (purity ≥ 99.9 %), colloidal silicon dioxide (SiO₂), microcrystalline cellulose 102 (MCC), dibasic calcium phosphate (CaHPO₄) (purity 98.0 - 105.0 %), Span 80 (SM) (purity > 60.0 %), Poloxamer 188 (80.2% of oxyethylene moieties), Isopropyl myristate (purity > 97.5 %), Sesame oil, and all other chemicals solvent were obtained from Sigma-Aldrich and Merck. Dimethyl sulfoxide (DMSO, purity 99.7 %) analytical grade was obtained by Proquimios, Neusilin US2 type I-A (Neusilin U2) were donated by Fuji Chemical Industry. The biorelevant media Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) and Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) were acquired from Biorelevant.com.

2.2. Methods

2.2.1. Development of Self-emulsifying drug delivery system

2.2.1.1. Solubility Studies

The solubility of the AmB in 45 different excipients (oils, surfactants, and co-surfactants) was evaluated using the shake flask method [23]. Briefly, an excess of AmB was added to 3 g of each excipient, with further homogenization (250 rpm, 25 ± 0.1 °C) for 48 h in an incubator shaker (KS 4000 IC, IKA, Germany). Afterward, the mixtures were placed in a centrifuge (Megafuge 16, Thermo Fisher Scientific, USA), for 30 min at $14,500 \times g$. This process was repeated until no pellet of AmB was observed. Subsequently, the drug was quantified in the supernatant as described in section *Quantification of AmB in the oils and lipid mixtures* (2.2.2.1.). Each experiment was carried out five times.

2.2.1.2. Pseudo-ternary phase diagram

To evaluate not only the effect of the oil-surfactant proportion but also the media composition in the self-emulsifying process, pseudo-ternary phase diagrams were formulated containing as oil phase a ratio of excipients that exhibited high AmB solubility. For this purpose, the assay was performed using the titration method [24]. Briefly, the oil phase was comprised of PPG:GMC (1:1 w/w), and SM was used as a surfactant. The oil-surfactant ratios ranged from 99:1 to 70:30, an excess of AmB was added to these mixtures, magnetically stirred for 5 minutes, and homogenized in an incubation shaker for 24 h (250 rpm, 25 °C). Afterward, the excess of AmB was withdrawn by multiple spin cycles as described for the solubility studies. Subsequently, the mixtures (2.5 g) were weighed, and the respective aqueous medium (ranging from 10% w/w to 90% w/w) was added dropwise. Thereafter, the samples were placed in an incubator shaker to further homogenization (150 rpm, 30 min, 37 °C). To better simulate the physiological conditions, this assay was performed with intestinal biorelevant media (FaSSIF or FeSSIF) as aqueous medium.

After each homogenization cycle, each system was visually evaluated and classified as emulsion (white milked aspect), microemulsion (limpid and translucent aspect), and phase separation (heterogeneous system) [25].

2.2.1.3. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems

Based on the phase behavior exhibited by different oil-surfactant mixtures in FaSSIF medium, two SEDDS formulations (Table 1) were chosen for further characterization, *viz*, AmB solubilization capacity, droplet size, and polydispersity index (PDI). The lipid mixture was prepared according to the methodology described in section *Development of Self-emulsifying drug delivery system* (2.2.1.). The self-emulsifying process was carried out in FaSSIF (oil phase:media ratio 1:99, 150 rpm, 37.0 ± 0.1 °C). After predetermined time intervals (1.5 h and 3.5 h) the samples were characterized as described in the appropriate section.

Table 1. Composition of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS)

Excipient	Formulation (% w/w)	
	F-70:30	F-80:20
Phosal 50 PG (PPG)	35	40
Imwitor 308 (GMC)	35	40
Span 80 (SM)	30	20

Note: the formulation ID highlights the oil:surfactant proportion, *i.e.*, F-70:30 and F-80:20 have 70:30 and 80:20 oil:surfactant proportion respectively.

2.2.2. Characterization

2.2.2.1. Quantification of AmB in the oils and lipid mixtures

The amount of AmB solubilized was measured by UV-Vis spectroscopy. First, the samples were diluted in a mixture of DCM:DMSO (8:2, v/v). Thereafter, scanning was performed in a range of 300–450 nm, with a stepwise of 0.1 nm, in a medium velocity. Afterward, the first derivative of the spectrum was calculated, and the absorbance values in the valley at 417 nm were applied in the standard curve previously validated with AmB in DCM:DMSO (8:2, v/v). The derivative spectrophotometry is based on the transformation of a typical spectrum by derivation into a derivative spectrum. This technique increases the number of absorption bands, which allows a satisfactory individualization of the constituents, and eliminates wide bands [26]. Such an approach was successfully applied to remove the interference caused by excipients that exhibited absorption at the same wavelength as AmB, therefore, allowing its adequate quantification.

2.2.2.2. Determination of hydrodynamic droplet size and polydispersity index

The hydrodynamic diameter of the SEDDS was determined by dynamic light scattering (DLS, Zetasizer 3000, Malvern Instruments Ltd, United Kingdom) using a photon correlation spectrometer model equipped with a laser beam at 632 nm wavelength. The samples were evaluated at 37 °C, and the scattering angle was settled to 90°. The described methodology was applied to characterize the samples prepared in sections *Formulation of self-emulsifying drug delivery systems* (2.2.1.3.) and *Development of solid self-emulsifying dosage forms* (2.2.3.). The results are expressed as an overall mean of three measurements, each one with 15 scans.

2.2.3. Development of solid self-emulsifying dosage forms

To evaluate how the self-emulsifying performance would be affected when the lipid formulations were present within distinguish drug dosage forms, three different formulations were prepared, namely, hard gelatin capsule filled with the lipid formulation (LC-F-70:30 or LC-F-80:20), hard gelatin capsule filled with granules containing the lipid formulation (GC-F-70:30 or GC-F-80:20) and tablets prepared from these granules (T-F70:30 or T-F-80:20).

To obtain the capsule filled with the lipid formulations, translucent hard gelatin capsules (size 00, ~0.95 mL) were filled with 0.65 mL of the lipid formulations (F-70:30 or F-80:20). To produce the granules, the lipid formulations (1 g) were poured into a container, followed by the gradual addition of the solid adsorbent material (SiO₂ and Neusilin U2 (1:1)). After each addition, the mixture was homogenized to achieve a uniform distribution of the lipid material. Once obtained a free-flowing solid powder (oil phase-adsorbent ratio 64:36), the material was subsequently passed through a sieve N° 20 (pore size 850 µm) to obtain standardized granules. Subsequently, the hard gelatin capsules were filled with 0.35 g of these granules. Moreover, to formulate the tablets, the granules were mixed with a powder mixture of MCC – and CaHPO₄

(1:1), keeping a granule-powder mixture ratio of 25:75. The mixture was compacted with flat-faced punches using a mechanical press (CE03, International Crystal Laboratories, USA) with constant pressure ($1,390 \pm 11$ psi) for 30 seconds producing discs with a surface area of 0.5 cm^2 .

2.2.4. Solid self-emulsifying dosage forms characterization

2.2.4.1. Specific surface area measurement of the granules

Nitrogen absorption-desorption isotherms were obtained using a surface area and pore size analyzer (NOVA e-4200, Quantachrome Instruments, USA). First, the granules containing the lipid formulation and the granules' raw materials were weighed until fill 2/3 of the total volume of the bulb. Afterward, the degassing phase was carried out under vacuum for 15 h at 50°C . It is noteworthy to mention that a previous evaluation was performed by TGA to guarantee that no sample degradation occurs at this temperature. The adsorption isotherms were collected with 21 points with the relative pressure (P/P_0) ranging from 0.01 to 0.99, while the desorption isotherms had 18 points from 0.98 to 0.05. All analyses were conducted using nitrogen as the adsorptive at 77 K. To calculate the surface area (SBET), the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation [27] was applied using 13 points between a P/P_0 ranging from 0.01 to 0.035. Moreover, only measurements with a correlation coefficient (R^2) higher than 0.995 were considered for this evaluation, and the BET C-values were calculated to evaluate changes in the interaction of the nitrogen with the surface of the sample [28].

2.2.4.2. Evaluation of the self-emulsifying performance

The self-emulsifying evaluation was carried out in an incubator shaker, where each dosage form was added to 250 mL of FaSSIF and homogenized (150 rpm, $37.0^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$) for 3 h. Thereafter, each system was withdrawn (3 mL), filtered with a 45 mm membrane, and characterized regarding their droplet size and PDI, as described in section *Determination of hydrodynamic droplet size and polydispersity index* (2.2.2.2.). Each experiment was performed three times.

2.2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc, USA). The results were exhibited as the mean of at least three individual experiments $\pm$ standard deviation of the mean. To establish the difference between the means, one or two-way analysis of variance (ANOVA) were performed with *post-hoc* of Tukey with a $\alpha < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Solubility

The dissolution process is one of the limiting steps to the oral absorption of BCS class IV drugs, such as AmB [12]. Therefore, to avoid this hindrance, the drug should be available as a molecular dispersion into the lipid formulation [29]. For this purpose, a solubility assay of the AmB was performed in 45 different excipients. The results revealed that the evaluated excipients displayed a considerable variability in their ability to solubilize AmB, of which 15 exhibited an AmB solubility lower than 0.001 mg/mL (Table 2). On the other hand, the PPG exhibited a remarkable AmB solubilization capacity (1.237 mg/mL), with values more than three-fold higher than the other excipients.

Even though part of these data agreed with the ones previously reported [24], others revealed divergent solubility values. Probable sources of variation could be the settled temperature, the period of homogenization, as well as the G-force applied during the centrifugation process. The selection of the excipients used to formulate the SEDDS considered not only the AmB solubility capacity but also the role of the excipient into the formulation (*e.g.*, oil, surfactant, or co-solvent), and the ease of the mixture to self-emulsifying, which was evaluated in previous experiments. Therefore, the selected oil phase was GMC:PPG (1:1), and SM as the surfactant.

Table 2. Amphotericin B solubility in lipid excipients at 25.0 ± 0.1 °C

Excipient	Solubility (mg/mL)
Capmul® MCM C8	0.083 ± 0.007
Capmul® MCM EP	0.142 ± 0.007
Capmul® GMO-50	0.035 ± 0.004
Crodamol® GMCC-SS	0.175 ± 0.007
Dhaytan® L 20	0.075 ± 0.004
Dhaytan® S 80	0.005 ± 0.000
Inwitor® 308	0.205 ± 0.053
Inwitor® 742	0.131 ± 0.021
Inwitor® 988	0.069 ± 0.004
Kolliphor® EL	0.020 ± 0.001
Kolliphor® RH 40	0.027 ± 0.001
Kollisolv® PEG 300	0.223 ± 0.011
Kollisolv® PEG 400	0.108 ± 0.008
Labrasol®	0.019 ± 0.001
Maisine® CC	0.006 ± 0.001
Pecol®	0.003 ± 0.000
Phosal® 50 PG	1.237 ± 0.107
Phosal® 50 SA+	0.110 ± 0.003
Phosal® 53 MCT	0.077 ± 0.004
Plurol® Oleique	0.022 ± 0.003
Softigen® 767	0.008 ± 0.001
Span® 80	0.013 ± 0.001
Super Refined® Castor Oil	0.022 ± 0.003
Super Refined® PEG 300	0.470 ± 0.133
Super Refined® PEG 400	0.339 ± 0.000
Super Refined® Polysorbate 80	0.070 ± 0.016
Transcutol® HP	0.083 ± 0.002
Tween® 20	0.003 ± 0.000
Tween® 40	0.004 ± 0.000
Tween® 80	0.004 ± 0.000
Capryol® 90	Not measurable
Captex® 100	Not measurable
Captex® 300	Not measurable
Captex® 355	Not measurable
Dhaykol® 6040	Not measurable
Isopropyl Myristate	Not measurable
Isopropyl Palmitate	Not measurable
Labrafac® Lipophile WL 1349	Not measurable

Labrafac® PG	Not measurable
Labrafil® M 1944 CS	Not measurable
Lauroglycol® 90	Not measurable
Miglyol® 812 N	Not measurable
Sesame oil	Not measurable
Super Refined® Arlasolve	Not measurable
Super Refined® Oleic Acid	Not measurable

3.2. Characterization of the SEDDS phase behavior

A pseudo-ternary phase diagram is a graphical approach that displays the phase behavior of the oil-water interface after adding an aqueous medium to a surfactant-oil mixture. Usually, the initial characterization of the obtained systems is by visual inspection, in which emulsions show milky appearance and microemulsions are optically translucent [30]. Despite being a qualitative and subjective method, the visual inspection indicates the dispersiveness of the mixture and provides a reliable forecast of the excipient proportions expected to exhibit an anomalous behavior in distinct assays [31].

Based on this approach, it was possible to infer that the mixtures formulated with SM, dispersed in FaSSIF, displayed a large microemulsion region (Figure 1A) corresponding to approximately 70% of the total area evaluated, followed by 26% of phase separation and approximately 4% of emulsion region. On the other hand, when the FeSSIF medium was added to the oily mixture, the microemulsion (~65%) and the phase separation (~9%) region decreased, whereas the emulsion region increased about 6.5 times (26%) (Figure 1B). These results may seem unexpected since the FeSSIF medium presents a higher concentration of surfactant than the FaSSIF one. However, the salinity content held by FeSSIF is about three times higher than FaSSIF (~1.8 g of NaCl /100 mL and 0.62 g of NaCl /100 mL, respectively) [32]. It has been reported that salinity is a parameter that plays a role in the phase behavior, as its increment enables the transition Winsor I $\rightarrow$ III $\rightarrow$ II [33, 34]. These results agree with the literature since SEDDS produced with FeSSIF were more polydisperse due to the higher mixed micelles concentration [33, 35]. Knowing that the oil phase (HLB ~ 6.25) is a 1:1 mixture of GMC (HLB ~ 6) [36] and PPG (HLB = 6.49, reported by Lipoid), it is possible to infer that the effectiveness of the interfacial stabilization provided by SM relies on its partitioning at the interface since it displays a hydrophobic feature (HLB = 4.3) [36].

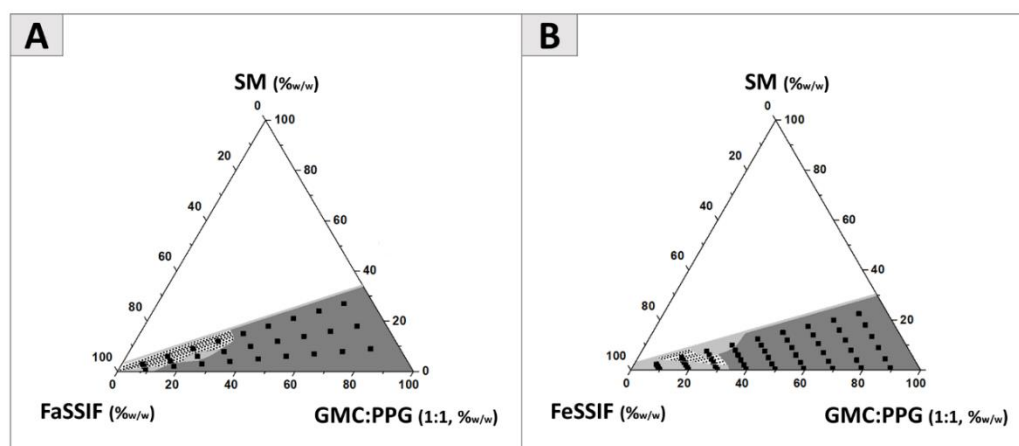


Figure 1. Pseudo-ternary phase diagram using Imwitor 308 (GMC) and Phosal 50 PG (PPG) (ratio 1:1) as oil phase; Span 80 (SM) as the surfactant; and Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) (A) or

Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) as aqueous phase (B). Key: (■) experimental data. The dark gray area corresponds to microemulsion; the light gray area describes the emulsion region; the dashed one is the phase separation area.

3.3. Self-emulsifying performance of lipid systems

Once established the boundaries of the relevant region in the pseudo-ternary phase diagram and relying on the requirements of (I) high AmB solubilization, (II) low amount of surfactant, and (III) appropriate amount of aqueous medium to simulate physiological conditions, two formulations were chosen (Table 1) and classified as type II according to the Lipid Formulation Classification System [37]. These SEDDS were characterized regarding their homogeneity, AmB solubility, polydispersity index, and hydrodynamic droplet size. This last feature has been assigned to provide adequate intestinal absorption when formulations display droplet sizes ranging from 100 nm to 300 nm [38].

Based on the droplet size displayed in Figure 2, it is possible to infer that, regardless of the formulation evaluated, the systems revealed a size distribution behavior that over time tends to achieve equilibrium as a bimodal distribution. An experimental data that supports this idea is the one exhibited by F-70:30, in which the droplet population ranging from 3 μm to 5 μm pointed out in 1:30 h is no longer detected after 3:30 h, which also explains the decrease in the PDI values (Figure 2A).

The bimodal population of the samples ranged from 50 nm to 100 nm and from 350 nm to 600 nm (Figure 2B). This distribution pattern explains the observed PDI values ranging from 0.3 to 0.5 (Figure 2A). On the other hand, the medium used to perform the emulsification process (FaSSIF) displayed a unimodal population (50 nm to 100 nm) (Figure 2B). Even though these data might suggest that the presence of this population in the distribution pattern displayed by the samples may be attributed to the medium, it is not possible to draw a reliable conclusion, using only DLS data, that the droplet size of the samples should be only addressed to the population ranging from 350 nm to 600 nm. Therefore, the Z-average (the overall mean) seems to be the appropriate approach.

Based on this perspective, no significant difference was found regarding the hydrodynamic diameter and the polydispersity index of the evaluated systems (p -value = 0.25, Figure 2A). Moreover, no difference in the AmB solubilization capacity was noticed, as formulations F-80:20 and F-70:30 displayed a solubilization of 0.678 ± 0.024 mg/mL and 0.623 ± 0.067 mg/mL, respectively. Revealing that the chosen formulations exhibited the following required features: appropriate dispersion in biorelevant medium, low surfactant concentration, and high AmB solubilization.

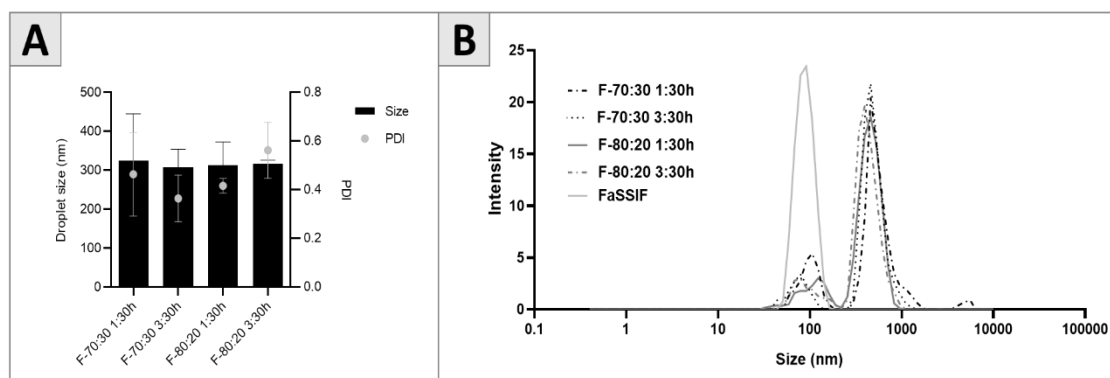


Figure 2. (A) Average droplet size and polydisperse index (PDI) of SEDDS formulations F-70:30 and F-80:20 at 1:30 h and 3:30 h. The results are expressed by mean $\pm$ SD. (B) Distribution of the droplet size produced by the formulations F-70:30 and F-80:20 at 1:30 h and 3:30 h and FaSSIF

3.4. Characterization of the solid dosage forms

3.4.1. Specific Surface area

To calculate the surface area (SBET) by gas adsorption it is commonly applied the BET equation to the isotherm. The suitability of the analysis is evaluated by the correlation coefficient (R^2) and the BET C-value, with the former corresponding to the linearity of the isotherm in the BET region, and the latter the interaction of the nitrogen with the sample. As depicted in Table 3, this mathematical approach displayed a good fitting with the experimental data (> 0.999) [28].

The C-value parameter in the BET equation not only expresses the extent of coverage of the adsorbate on the adsorbent but also the affinity between them. All samples analyzed presented a C-value higher than 2, which confirms that the BET equation can be used to calculate the surface area (Table 2) [28]. The granules containing the lipid formulation exhibited lower values of BET C-values when compared to the solid raw excipients, indicating that the presence of the lipid formulation affected the interaction between the sample (adsorbent) and the nitrogen (adsorbate). Furthermore, as reported by Lapham *et al.* BET C-values as the ones obtained in this study are closer to 10, which makes the distinction between isotherm II and III a challenging task [28].

The SBET values calculated for Neusilin U2 and colloidal SiO₂ agree with those previously reported in the literature [38]. Also, as expected, the Neusilin U2:colloidal SiO₂ mixture (1:1) exhibited intermediate surface area values compared with its isolated constituents (Table 3). Besides, the Neusilin U2 had a higher surface area. When the SEDDS were incorporate into it, the obtained powder exhibited poor flowability. To solve this problem colloidal SiO₂ was added, and all the granules were prepared with Neusilin U2:colloidal SiO₂ mixture (1:1).

When compared to the one exhibited by the colloidal silicon alone, the large surface area of the mixture suggests that the mixture can be a better reservoir for the pre-emulsion SEDDS [39]. The decrease in the SBET values and the total pore volume of the granules, when compared to the Neusilin U2:colloidal SiO₂ mixture (1:1), indicates that the adsorption of the pre-emulsion SEDDS where effective, with nearly 96% of the total pore volume and the specific surface area filled by the lipid formulation (Table 3).

Table 3. Specific surface area (SBET), BET correlation coefficient (R^2), BET C-value, and total pore volume of solid components of granules and sample granules.

Sample	SBET (m ² /g)	R ²	BET C-value	Total pore volume (mL/g)
--------	--------------------------	----------------	-------------	--------------------------

Neusilin U2	272.604	0.9998	181.676	0.8479
SiO ₂	150.062	0.9997	37.430	0.2650
SiO ₂ :Neusilin U2 (1:1)	212.166	0.9997	32.715	0.7195
F-70:30 granules	3.068	0.9996	13.924	0.0211
F-80:20 granules	10.792	0.9989	10.022	0.0409

Note: the formulation ID highlights the oil:surfactant proportion, i.e., granules of F-70:30 and F-80:20 were prepared with self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) having 70:30 and 80:20 oil:surfactant proportion respectively. Neusilin U2 and SiO₂ denotes the amorphous form of magnesium aluminometasilicate and colloidal silicon dioxide respectively.

3.4.2. Self-emulsifying performance of solid dosage forms

Regarding the emulsification behavior exhibited by different drug dosage forms in FaSSIF, the data revealed that the addition of the liquid lipid formulations to the capsules did not affect the emulsification process in terms of average droplet size (p -value = 0.421, Table 4 and Figure 3A). The comparison of the average droplet size and PDI values revealed that the composition of the lipid formulation did not affect the average droplet size displayed by the system, i.e., there was no significant difference in the droplet size and PDI values exhibited by the same dosage form manufactured with different lipid formulations ($p > 0.05$). On the other hand, different dosage forms displayed significant differences among each other ($p < 0.05$) with average droplet size values revealing the following pattern: capsule filled with liquid lipid formulation (LC) > capsule filled with granules (GC) = tablet (T) (Table 4 and Figure 3). This pattern highlights that the hydrodynamic diameter displayed by the droplets from granules and tablets significantly decreased compared to the ones from LC (respectively p -value < 0.014 and p -value < 0.012, Table 4). In contrast, there was no significant difference between granules and tablets regardless of the SEDDS formulation (p -value > 0.994). As stated by Joyce *et al.*, the adsorption of liquid SEDDS into solid carriers can significantly affect the interfacial surface area of the lipid [40]. These results corroborate with this hypothesis, suggesting that the enhancement in the self-emulsifying performance was caused by the increment of the surface area when the SEDDS were added to the adsorbent material, favoring the SEDDS-FaSSIF interaction.

Table 4. Average droplet size (nm) and PDI of the capsules filled with liquid lipid formulation (LC), capsules filled with granulated SEDDS (GC), and tablets (T) with the SEDDS formulations F-70:30 and F-80:20.

Formulation	Droplet size (nm)($\pm$ SD)	PDI($\pm$ SD)
LC-F-70:30	382.8 ($\pm$ 98.76)	0.57 ($\pm$ 0.12)
LC-F- 80:20	327.9 ($\pm$ 31.15)	0.44 ($\pm$ 0.03)
GC-F-70:30	136.0 ($\pm$ 40.93)	0.30 ($\pm$ 0.06)
GC-F-80:20	156.4 ($\pm$ 37.12)	0.33 ($\pm$ 0.08)
T-F-70:30	153.7 ($\pm$ 21.70)	0.36 ($\pm$ 0.02)
T-F-80:20	134.3 ($\pm$ 36.11)	0.31 ($\pm$ 0.08)
FaSSIF	85.8 ($\pm$ 3.40)	0.01 ($\pm$ 0.01)

Note: the formulation ID highlights the oil:surfactant proportion, i.e., F-70:30 and F-80:20 have 70:30 and 80:20 oil:surfactant proportion respectively.

It is noteworthy to mention the average droplet size exhibited by the dosage forms is in a range assigned as ideal for intestinal absorption [41]. Therefore, highlighting the potential of these systems as carriers for oral administration. However, the amount of SEDDS carried by the

solid raw material is lower in granules and tablets than in the LC. From this point of view, it is possible to conclude that granules and tablets are suitable for carrying drugs that require low oral doses. Which does not apply to AmB. For this reason and considering that the LC carried *ca.* 0.42 mg/dose, while granules and tablets exhibited respectively *ca.* 65% and 93% less drug, it is possible to infer that LC is the most appropriate system to be used in an AmB oral dosage regimen.

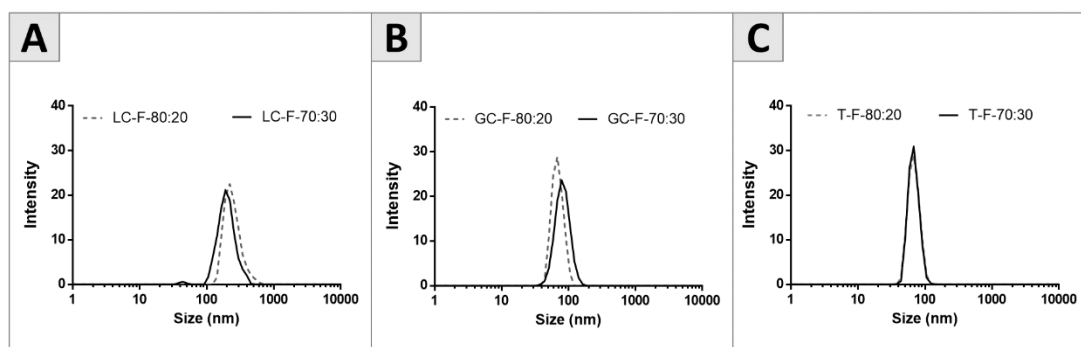


Figure 3. Distribution droplet size measured from the different dosage forms loaded with SEDDS F-70:30 or F-80:20, 3 h after agitation, and FaSSIF. (A) Liquid-filled capsules. (B) Capsules filled with granules. (C) Tablet.

4. CONCLUSIONS

The results revealed that the 45 different excipients evaluated exhibited a heterogeneous AmB solubilization capacity, with PPG exhibiting the maximum one, more than three-fold higher than the other excipients. The phase behavior of the chosen mixture demonstrated through the pseudo-ternary phase diagram that the emulsification process was enhanced in FaSSIF medium when compared with FeSSIF. Most likely due to the higher salinity content displayed by the last one, which might trigger the transition Winsor I $\rightarrow$ III $\rightarrow$ II when compared with FaSSIF. This observation suggested that the fasted state may be the appropriate condition when performing *in vivo* studies. The chosen lipid formulations (F-80:20 and F-70:30) displayed a similar behavior with a bimodal population (from 50 nm to 100 nm and from 350 nm to 600 nm) and no significant difference regarding the hydrodynamic diameter, the polydispersity index, as well as the AmB solubilization capacity. The values of pore volume and surface area of the granules suggest both formulations were successfully incorporated in the mixture of colloidal silicon dioxide and Neusilin U2 (1:1). Once added to dosage forms, these formulations displayed a monomodal distribution. However, its lipid load was 13.5 times lower than the one used to manufacture the LFC. Even though the AmB dose carried by the tablets does not seem to be appropriated to its clinical use (*e.g.*, the treatment of leishmaniasis), this technology can be applied to drugs that require lower oral doses (*i.e.*, drug with high potency). Thus, the LFC is apparently the appropriate drug dosage form, displaying the highest lipidic load among all the evaluated formulations, and exhibiting an average droplet size in an ideal range for intestinal absorption. Therefore, highlighting the potential of this system as an AmB carrier for oral administration.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), The Brazilian Development Bank (BNDES) [grant number Funtec 0473/2015], Carlos Chagas Filho Research Support Foundation of Rio de Janeiro (FAPERJ) [grant E-26/202.951/2018 and E-26/200.210/2023-Bolsa], and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grant PIBITI/2019/2020]. Moreover, the authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.A.Jr, M.A.S., H.V.A.R., B.F.C.P.; methodology, F.A.Jr, M.A.S., G.B., L.A.H.N., T.M.S., H.V.A.R., B.F.C.P.; validation, F.A.Jr, G.B., L.A.H.N.; investigation, F.A.Jr, M.A.S., G.B., L.A.H.N., T.M.S., B.F.C.P.; writing—original draft preparation, F.A.Jr, M.A.S., B.F.C.P.; review and editing, K.G.H.S., L.D.P., H.V.A.R.; supervision, K.G.H.S., L.D.P., H.V.A.R., B.F.C.P.; project administration, H.V.A.R., B.F.C.P.; funding acquisition, H.V.A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors have no conflict of interest.

REFERENCES

1. F. Ibrahim, O. Sivak, E.K. Wasan, K. Bartlett & K.M. Wasan. Efficacy of an oral and tropically stable lipid-based formulation of Amphotericin B (iCo-010) in an experimental mouse model of systemic candidiasis. *Lipids in Health and Disease*, **12**, 158 (2013) Doi: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-158>
2. A. Lemke, A.F. Kiderlen & O. Kayser. Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 151 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>
3. WHO. *World Health Organization Model List of Essential Medicines - 22nd Edition*. World Health Organization, Geneva, 2021; 66 p. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>
4. D.W. Bates, L. Su, D.T. Yu, G.M. Chertow, D.L. Seger, D.R.J. Gomes, E.J. Dasbach & R. Platt. Mortality and costs of acute renal failure associated with Amphotericin B therapy. *Clinical Infectious Diseases*, **32**(5), 686–693 (2001) Doi: <https://doi.org/10.1086/319211>
5. R.A. Zager, C.R. Bredl & B.A. Schimpf. Direct amphotericin B-mediated tubular toxicity: Assessments of selected cytoprotective agents. *Kidney International*, **41**, 588–1594 (1992) Doi: <https://doi.org/10.1038/ki.1992.229>
6. J. Barwicz, S. Christian & I. Gruda. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**(10), 2310–2315 (1992) Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.36.10.2310>
7. D.R. Serrano & A. Lalatsa. Oral amphotericin B: The journey from bench to market. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **42**, 75–83 (2017) Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.017>
8. S. Chakraborty, D. Shukla, B. Mishra & S. Singh. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **73**(1), 1–15 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.001>
9. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy & P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **46**(1-3), 3–26 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)

10. G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah & J.R. Crison. A theoretical basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, **12**, 413–420 (1995). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>
11. C.-Y. Wu & L.Z. Benet. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/Absorption/Elimination interplay and development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research*, **22**, 11–23 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9004-4>
12. R. Ghadi & N. Dand. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. *Journal of Controlled Release*, **248**, 71–95 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.014>
13. B. Rivnay, J. Wakim, K. Avery, P. Petrochenko, J.H. Myung, D. Kozak, S. Yoon, N. Landrau & A. Nivorozhkin. Critical process parameters in manufacturing of liposomal formulations of amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*, **565**, 447–457 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.052>
14. C.W. Pouton. Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, **27**(2-3), 335–348 (1985). Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(85\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(85)90081-X)
15. J. Liu, C. Hirschberg, M. Fanø, H. Mu & A. Müllertz. Evaluation of self-emulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery using an in vitro model simulating the intestinal proteolysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **147**, 105272 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105272>
16. A. Patel, P. Shelat & A. Lalwani. Development and optimization of solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) using Scheffe's design for improvement of oral bioavailability of nelfinavir mesylate. *Drug Delivery and Translational Research*, **4**, 171–186 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13346-014-0191-1>
17. B. Tang, G. Cheng, J.-C. Gu & C.-H. Xu. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today*, **13**(13-14), 606–612 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.04.006>
18. J. Mandić, A. Zvonar Pobirk, F. Vrečer & M. Gašperlin. Overview of solidification techniques for self-emulsifying drug delivery systems from industrial perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, **533**(2), 335–345 (2017) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.036>
19. Y. Choudhari, U. Reddy, F. Monsuur, T. Pauly, H. Hoefer & W. McCarthy. Comparative evaluation of porous silica based carriers for lipids and liquid drug formulations. *Open Material Sciences*, **1**, 61–74 (2014). Doi: <https://doi.org/10.2478/mesbi-2014-0004>
20. A. Tan, S. Rao & C.A. Prestidge. Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: An overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. *Pharmaceutical Research*, **30**, 2993–3017 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1107-3>
21. A. Seo, P. Holm, H.G. Kristensen, T. Schæfer. The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *International Journal of Pharmaceutics*, **259**(1-2), 161–171 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00228-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00228-X)
22. A.S. Narang, D. Desai & S. Badawy. Physicochemical interactions in solid dosage forms. *Pharmaceutical Research*, **29**, 2635–2638 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0867-5>
23. M.M. Gade & P.J. Hurkadale. Formulation and evaluation of self-emulsifying orlistat tablet to enhance drug release and *in vivo* performance: factorial design approach. *Drug Delivery and Translational Research*, **6**, 276–288 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0289-8>
24. C. Salerno, S. Gorzalczy, A. Arechavala, S.L. Scioscia, A.M. Carlucci & C. Bregni. Novel gel-like microemulsion for topical delivery of Amphotericin B. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **44**(3), 359–381 (2015). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n3.56285>
25. S.G. Gumaste, B.O.S. Freire & A.T.M. Serajuddin. Development of solid SEDDS, VI: Effect of pre-coating of Neusilin® US2 with PVP on drug release from adsorbed self-emulsifying lipid-based

- formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **110**, 124–133 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.022>
26. E.N. Vaikosen, S.J. Bunu, J.N. Oraeluno & D. Friday. Comparative application of derivative spectrophotometric and HPLC techniques for the simultaneous determination of lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in fixed-dose combined drugs. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, **9**, 21 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1186/s43094-023-00471-7>
27. S. Brunauer, P.H. Emmett & E. Teller. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, **60**(2), 309–319 (1938). Doi: <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>
28. D.P. Lapham & J.L. Lapham. Gas adsorption on commercial magnesium stearate: Effects of degassing conditions on nitrogen BET surface area and isotherm characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, **530**(1-2), 364–376 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.003>
29. K. AboulFotouh, A.A. Allam, M. El-Badry & A.M. El-Sayed. Role of self-emulsifying drug delivery systems in optimizing the oral delivery of hydrophilic macromolecules and reducing interindividual variability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **167**, 82–92 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.034>
30. E.S. Mahdi, M. Sakeena, M. Abdulkarim, G. Abdullah, M.Z. Abdul-Sattar & A. Noor. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. *Drug Design, Development and Therapy*, **5**, 311–323 (2011). Doi: <https://doi.org/10.2147/dddt.s15698>
31. D.Q.M. Craig, S.A. Barker, D. Banning & S.W. Booth. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, **114**(1), 103–110 (1995). Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00222-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00222-Q)
32. S. Klein. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS Journal*, **12**, 397–406 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9203-3>
33. S. Ahmed & K.A. Elraies. Microemulsion in enhanced oil recovery. In: Selcan Karakuş (editor). *Science and Technology Behind Nanoemulsions*. InTechOpen, London, 2018. Doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75778>
34. M. Sanchez-Dominguez, C. Aubery & C. Solans. New trends on the synthesis of inorganic nanoparticles using microemulsions as confined reaction media. In: A. Hashim (editor). *Smart Nanoparticles Technology*. InTechOpen, London, 2012. Doi: <https://doi.org/10.5772/33010>
35. E. Kontogiannidou, T. Meikopoulos, C. Virgiliou, N. Bouropoulos, H. Gika, I.S. Vizirianakis, A. Müllertz & D.G. Fatouros. Towards the development of Self-Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) containing trimethyl chitosan for the oral delivery of amphotericin B: *In vitro* assessment and cytocompatibility studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **56**(Part A), 101524 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101524>
36. I. Nardin & S. Köllner. Successful development of oral SEDDS: Screening of excipients from the industrial point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **142**, 128–140 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.014>
37. C.W. Pouton. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **29**(3-4), 278–287 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.016>
38. Z. Ujhelyi, M. Vecsernyés, P. Fehér, D. Kósa, P. Arany, D. Nemes, D. Sinka, G. Vasvári, F. Fenyvesi, J. Váradi & I. Bácskay. Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. *Drug Discovery Today: Technologies*, **27**, 81–86 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>
39. G. Quan, Q. Wu, X. Zhang, Z. Zhan, C. Zhou, B. Chen, Z. Zhang, G. Li, X. Pan & C. Wu. Enhancing *in vitro* dissolution and in vivo bioavailability of fenofibrate by solid self-emulsifying matrix combined with SBA-15 mesoporous silica. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **141**, 476–482 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.013>

40. P. Joyce, T.J. Dening, T.R. Meola, H.B. Schultz, R. Holm, N. Thomas & C.A. Prestidge. Solidification to improve the biopharmaceutical performance of SEDDS: Opportunities and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **142**, 102–117 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.11.006>
41. E. Franceschinis, A.C. Santomaso, L. Benda, B. Perissutti, D. Voinovich & N. Realdon. Influence of process variables on the properties of simvastatin self-emulsifying granules obtained through high shear wet granulation. *Powder Technology*, **274**, 173–179 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.01.026>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

F.A.-Jr, M.A. Sarcinelli, G. Barcellos, L.A.H. Nascimento, T.M. Silva, KG.H. Silva, L.D. Prado, H.V.A. Rocha & B.F.C. Patricio. Solid Self-Emulsifying Dosage Forms for carrying Amphotericin B: A preformulation study. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 231–214 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119557>

Desarrollo y caracterización de un comprimido flotante a base de arcilla Montmorillonita y HPMC para liberación prolongada

Perla García-Guzmán*, Leticia Ortega Almanza, Liliana Schifter Aceves & Edgar Solís-Candelas

Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) - Campus Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México, CDMX, México. *Correo electrónico: pgarcía@correo.xoc.uam.mx

Recibido: 17 de julio de 2024

Corregido: 2 de febrero de 2025

Aceptado: 6 de febrero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119558>

RESUMEN

Introducción: los comprimidos flotantes consisten sistemas de baja densidad que pueden flotar en el contenido gástrico, por acción de atrapamiento de aire, ya sea con cámaras de aire o agentes efervescentes, manteniéndose por más tiempo en el estómago permitiendo un perfil de liberación prolongada. La combinación de arcillas y polímeros en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos resulta muy útil pues se mejora las propiedades mecánicas, la estabilidad, la resistencia a disolventes o gases, mejora propiedades superficiales y la biocompatibilidad. **Objetivo:** Desarrollo y caracterización de un sistema flotante efervescente para liberación prolongada, a base de HPMC y arcilla Montmorillonita. **Métodos:** Se fabricaron los comprimidos mediante granulación vía húmeda y se caracterizaron mediante pruebas farmacopéicas incluyendo estudios de liberación *in vitro* empleando metformina como fármaco modelo. **Resultados:** Mediante un diseño Taguchi L3² se obtuvieron 4 formulaciones de comprimidos flotantes con tiempos de liberación de 8 hasta 24 h. Las formulaciones 2 y 4 cumplieron con los requisitos de para liberación prolongada de acuerdo a la USP. Se observó que la combinación de HPMC y Montmorillonita favoreció la liberación prolongada mediante la formación de gel y aumento en la tortuosidad. **Conclusiones:** Se obtuvieron cuatro formulaciones de comprimidos flotantes efervescentes de liberación prolongada. La combinación de arcilla Montmorillonita y HPMC tuvo un impacto en las propiedades estructurales y de barrera (tortuosidad) para controlar la liberación, la cual depende de la proporción empleada en la combinación de polímero y arcilla y su capacidad para estabilizar la estructura del gel.

Palabras clave: Comprimidos flotantes; liberación prolongada; Montmorillonita; HPMC; Metformina

SUMMARY

Development and characterization of a floating tablet based on Montmorillonite clay and HPMC for prolonged release

Introduction: Floating tablets consist of low-density systems that can float in the gastric contents, by air entrapment action, either with air chambers or effervescent agents, remaining longer in the stomach allowing a prolonged release profile. The combination of clays and polymers in the development of new drug delivery systems is very useful as it improves mechanical properties, stability, resistance to sol-

vents or gases, improves surface properties and biocompatibility. **Objective:** Development and characterization of an effervescent floating system for prolonged release, based on HPMC and Montmorillonite clay. **Methods:** The tablets were manufactured by wet granulation and characterized by pharmacopoeial tests including *in vitro* release studies using metformin as a model drug. **Results:** Using a Taguchi design, 4 formulations of floating tablets with release times of 8 to 24 h were obtained. Formulations 2 and 4 met USP extended-release requirements. It was observed that the combination of HPMC and Montmorillonite favored prolonged release through gel formation and increased tortuosity. **Conclusions:** Four formulations of extended-release effervescent floating tablets were obtained. The combination of Montmorillonite clay and HPMC had an impact on the structural and barrier properties (tortuosity) to control release, which depends on the ratio used in the polymer-clay combination and its ability to stabilize the gel structure.

Keywords: Floating tablets; extended release; Montmorillonite; HPMC; Metformin

RESUMO

Desenvolvimento e caracterização de um comprimido flutuante à base de argila montmorilonita e HPMC para liberação prolongada

Introdução: Os comprimidos flutuantes consistem em sistemas de baixa densidade que podem flutuar no conteúdo gástrico por aprisionamento de ar, seja com câmaras de ar ou agentes efervescentes, permanecendo mais tempo no estômago, permitindo um perfil de liberação prolongado. A combinação de argilas e polímeros no desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos é muito útil porque melhora as propriedades mecânicas, a estabilidade, a resistência a solventes ou gases, melhora as propriedades da superfície e melhora a biocompatibilidade. **Objetivo:** Desenvolvimento e caracterização de um sistema flutuante efervescente de liberação prolongada, à base de HPMC e argila montmorilonita. **Métodos:** Os comprimidos foram fabricados por granulação úmida e caracterizados por testes farmacopeicos, incluindo estudos de liberação *in vitro* usando metformina como medicamento modelo. **Resultados:** Utilizando um delineamento Taguchi L32, foram obtidas 4 formulações de comprimidos flutuantes com tempos de liberação de 8 a 24 h. As formulações 2 e 4 atenderam aos requisitos de liberação prolongada de acordo com a USP. Observou-se que a combinação de HPMC e montmorilonita favoreceu a liberação prolongada através da formação de gel e aumentou a tortuosidade. **Conclusões:** Foram obtidas quatro formulações de comprimidos efervescentes flutuantes de liberação prolongada. A combinação de argila montmorilonita e HPMC teve impacto nas propriedades estruturais e de barreira (tortuosidade) para controlar a liberação, que depende da proporção usada na combinação de polímero e argila e sua capacidade de estabilizar a estrutura do gel.

Palavras-chave: Pastilhas flutuantes; liberação prolongada; Montmorilonita; HPMC; Metformina

1. INTRODUCCIÓN

Las formas farmacéuticas de liberación modificada han sido diseñadas con el fin de modificar el sitio o la velocidad a la que es liberado el principio activo. Las ventajas de estas formas de liberación modificada incluyen la reducción de la frecuencia de administración, reducción de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas, control del sitio de liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal, mejorar la biodisponibilidad etc. Dentro de las formas de liberación modificada, existen diferentes sistemas como los comprimidos flotantes, los cuales consisten sistemas de baja densidad que pueden flotar en el contenido gástrico, por acción de atrapamiento de aire, ya sea con cámaras de aire o agentes efervescentes, manteniéndose por

más tiempo en el estómago [1]. Los sistemas flotantes logran un perfil de administración prolongado debido a que permanecen en el estómago por un intervalo de tiempo suficiente, soportando las condiciones gástricas y liberando el fármaco de forma sostenida, manteniendo una concentración del principio activo en la circulación sistémica. Los sistemas flotantes pueden ser efervescentes o no efervescentes. En los efervescentes se incluyen en su formulación excipientes formadores de gas (sales de bicarbonato o agentes ácidos) los cuales producen dióxido de carbono en presencia del ácido gástrico, el gas producido mantiene flotando el sistema. Mientras que los comprimidos no efervescentes incluyen un alto nivel (20-75%) de excipientes hinchables y formadores de gel como polímeros derivados de celulosa [2]. Entre los polímeros hidrofílicos más usados en la elaboración de matrices de liberación modificada se encuentra la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) que al entrar en contacto con agua o fluido gastrointestinal, se hidrata y forma rápidamente un gel viscoso que permite la relajación y separación de las cadenas del polímero, mostrando una reducción en el valor de temperatura de transición vítrea (T_g), lo que favorece la difusión del principio activo [3].

Por otro lado la arcilla montmorillonita (MMT) es una arcilla de origen natural que pertenece a la familia de las esmetictas, las cuales presentan una estructura de capas 2:1, en la que una capa octaédrica se encuentra entre dos capas tetraédricas, y en la que la superficie siempre está oxigenada por una capa de grupos siloxano. Esta arcilla tiene excelentes propiedades de hinchamiento, adsorción, tixotropía y formación de geles [4]. La combinación de arcillas y polímeros en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos resulta muy útil pues se mejora las propiedades mecánicas, la estabilidad dimensional, la resistencia a disolventes o gases, mejora propiedades superficiales y la biocompatibilidad [5]. Debido a esto se propuso como objetivo el desarrollo y caracterización de un sistema flotante efervescente para liberación prolongada, a base de una combinación de HPMC y arcilla montmorillonita, para evaluar sus propiedades de hinchamiento/erosión así como el efecto de su combinación en el perfil de liberación *in vitro*, empleando Clorhidrato de metformina como fármaco modelo de alta solubilidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

La hidroxipropil metilcelulosa 90 SH-100000 (HPMC) se obtuvo de SHIN-ETSU CHEMICAL, polivinilpirrolidona (PVP K-30) se obtuvo de Droguería Cosmopolitana. El bicarbonato de sodio (BS) y el ácido clorhídrico (HCl) fueron de JT Baker, el estearato de magnesio se obtuvo de Química Lufra y la arcilla montmorillonita (MMT) de Sigma-Aldrich. El clorhidrato de metformina (MEH) se obtuvo de Simbiotik. Todas las soluciones se prepararon de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13ª edición (2021).

2.2. Metodología

Se empleó un diseño experimental Taguchi L_{32} con 3 factores controlables en dos niveles cada uno, con lo que se obtuvieron 4 formulaciones (**Tabla 1**). Se estudió la cantidad (%) de MMT, HPMC y BS. Se utilizó clorhidrato de metformina (MEH) como fármaco modelo de alta solubilidad. Los demás componentes de la formulación, como MEH, PVP y estearato de magnesio (EM), permanecieron constantes.

2.2.1. Fabricación de comprimidos

Se utilizó el método de granulación vía húmeda para obtener los comprimidos. Las materias primas se tamizaron (malla #60) y se mezclaron durante 10 minutos a 30 rpm. Posteriormente, la mezcla de polvo se humedeció con una solución de PVP K-30. La masa húmeda se tamizó (malla #18) y se secó en horno estático (estufa de secado BG) a 60 °C hasta alcanzar una humedad de 1 a 3% (Termobalanza ROCA). Los gránulos secos se tamizaron (malla #18) y se mezclaron con BS (malla #60) durante 5 minutos a 30 rpm. Finalmente, el gránulo se mezcló con EM (malla #60) durante 2 minutos a 30 rpm. La mezcla de polvo resultante se comprimió usando un juego de punzones de cara plana de 13 mm en una prensa hidráulica de laboratorio con 4000 psi (Prensa hidráulica Enerpac P392).

Tabla 1. Composición de formulaciones por diseño experimental Taguchi L4 2³

Componente	Formulación 1 (F1)	Formulación 2 (F2)	Formulación 3 (F3)	Formulación 4 (F4)
MMT (g)	0,150	0,150	0,200	0,200
HPMC (g)	0,075	0,150	0,075	0,150
BS (g)	0,075	0,100	0,075	0,100
PVP K-30	0,065	0,065	0,065	0,065
EM (g)	0,010	0,010	0,010	0,010
MEH (g)	0,750	0,750	0,750	0,750

2.2.2. Evaluación de gránulos

La caracterización reológica de los gránulos se llevó a cabo mediante parámetros de precompresión tales como determinaciones de densidad aparente y compactada, índice de Carr, índice de Hausner, velocidad de flujo y ángulo de reposo (n=3) de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

2.2.3. Evaluación de comprimidos

Se evaluaron los comprimidos formulados en cuanto a variación de peso (balanza analítica SHIMADZU), dureza (n=10) (durómetro ERWEKA) y prueba de friabilidad (Friabilizador Elecsa) de acuerdo a la FEUM.

2.2.4. Contenido de fármaco

Se pulverizaron los comprimidos y se tomó la cantidad de polvo equivalente a 100 mg de MEH, se transfirió a un matraz aforado de 100 ml con agua. Posteriormente, se filtró 1 ml de la solución y se diluyó en 100 ml de agua. La medición se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS (Espectrofotómetro UV-VIS VELAB 85) a una longitud de onda de 232 nm (n=3). El contenido de MEH se calculó a partir de una curva de calibración de 8 puntos de concentración de 1 a 20 µg/ml (n=3).

2.2.5. Perfil de Liberación *in vitro* y cinética de liberación

El perfil de liberación *in vitro* se realizó con un aparato II (Disolutor LABINDIA modelo DS 8000) a 100 rpm con 900 ml de un fluido gástrico simulado previamente desgasificado (pH 1,2) consistente en una solución de HCl 0,1 N a 37±0,5 °C como medio de disolución. Se extrajeron muestras de 5,0 ml a intervalos de tiempo predeterminados (0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h) y se reemplazaron con medio fresco. Las alícuotas se filtraron (0,45 µm) y para la cuantificación de MEH se utilizó una curva de calibración con HCl 0,1 N (n=3) en concentración de 1 a 50 µg/ml. La medición se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS (Espectrofotómetro UV-VIS VELAB 85) a una longitud de onda de 232 nm.

El mecanismo de liberación se determinó ajustando los datos de liberación *in vitro* a los siguientes modelos matemáticos. Se determinó el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}). Los valores más altos de R^2 y R^2_{adj} se consideraron como el modelo de mejor ajuste.

Cinética de liberación de orden cero	$Q = Q_0 + k_0 t$
Cinética de liberación de primer orden	$\log C_t = \log C_0 - k t / 2.303$
Higuchi	$Q = KH t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$Mt / M\alpha = K t^n$
Hixson-Crowell	$Qt^{1/3} = Q_0^{1/3} - K_{HC} t$
	$Q_0^{1/3} - Qt^{1/3} = K_{HC} t$

2.2.6. Índices de hinchamiento-erosión y propiedades de flotación *in vitro*

Las propiedades de flotación *in vitro* se caracterizaron a partir del tiempo de retardo de flotación y del tiempo de flotación total. Los comprimidos se colocaron individualmente en vasos de precipitados que contenían 100 ml de líquido gástrico simulado (HCl 0,1 N) a $37 \pm 0,5$ °C [6]. El tiempo necesario para que la tableta flote se determinó como tiempo de retardo de flotación, también se midió el tiempo total en el que la tableta permaneció en flotación. Los índices de hinchamiento y erosión se determinaron mediante el método de análisis gravimétrico. Se pesaron los comprimidos secos y se colocaron en el medio de prueba. En experimentos separados, los comprimidos se retiraron del medio de disolución a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 horas y se secaron ligeramente con papel de filtro para eliminar el exceso de agua. Los comprimidos hinchados se pesaron para determinar el grado de absorción de agua y luego se secaron en estufa a 40 °C durante 12 h, y se pesaron nuevamente denominándose esta última medida peso seco [7]. El índice de hinchamiento y el índice de erosión se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ hinchamiento} = \frac{Ws - Wi}{Wi} \times 100$$

$$\% \text{ erosion} = \frac{Wi - Wt}{Wi} \times 100$$

Donde Ws es el peso de las muestras hinchadas en el momento del muestreo, Wi es el peso inicial del comprimido y Wt es el peso de los comprimidos secos en el momento del muestreo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los comprimidos flotantes se prepararon según el diseño experimental de Taguchi utilizando combinaciones de un polímero hinchable HPMC, arcilla de montmorillonita como agente de control de la desintegración y bicarbonato de sodio como agente generador de gas (CO_2) para inducir la flotación. Los comprimidos flotantes como sistema de liberación prolongada gastro resistente se han reportado empleando matrices a base de polímeros hidrofílicos como HPMC [8], combinaciones de polímeros como HPMC y goma acacia [9], carbopol o alginato de sodio [10], combinaciones de polímeros con materiales lipídicos como behenato de glicerilo o palmi-toestearato de glicerilo [11], HPMC y alcohol cetílico [10]. Sin embargo, existen pocos estudios

de la obtención de comprimidos flotantes a base de polímeros y materiales inorgánicos como arcillas. Se ha reportado el uso de bentonita en la obtención de comprimidos de liberación sostenida [12], comprimidos a base de combinaciones de HPMC y bentonita [13], finalmente se ha estudiado las propiedades de liberación prolongada de la MMT con HPMC [14]. La fabricación se realizó mediante granulación vía húmeda, obteniéndose gránulos de tamaño de partícula homogéneo con buenas propiedades reológicas y de compresibilidad alcanzando valores de humedad de 1,40 a 2,71 %. En la **Tabla 2** se presentaron los resultados obtenidos de parámetros de precompresión como densidad aparente y compactada, índice de Carr, índice de Hausner, velocidad de flujo y ángulo de reposo. Todas las formulaciones presentaron excelentes propiedades de fluidez, según el ángulo de reposo (15-18°) e índice de Hausner (0,81-0,84), y excelentes propiedades de compresión, según el índice de Carr (5-11).

Tabla 2. Evaluación reológica de gránulos

Formulación	Densidad aparente (g/ml)	Densidad compactada (g/ml)	Índice Carr	Índice de Hausner	Ángulo de reposo (°)
F1	0,251±0,039	0,519±0,033	17,622±0,268	0,824±0,043	15,810±0,231
F2	0,453±0,003	0,553±0,005	18,114±0,118	0,819±0,001	18,433±0,280
F3	0,492±0,003	0,588±0,000	16,390±0,591	0,836±0,006	15,959±0,577
F4	0,473±0,014	0,558±0,004	15,317±1,913	0,847±0,019	16,558±0,779

Todas las formulaciones permitieron obtener comprimidos redondos de color blanco sin partículas extrañas de 13 mm de diámetro con buenas características físicas, como se muestra en la **Tabla 3**. Todas las formulaciones mostraron una variación de peso de CV≤ 5% y las especificaciones de dureza deseadas (12-14 Kp). Los comprimidos mostraron buena resistencia a la abrasión en la prueba de friabilidad con una pérdida de peso no superior al 1% y un contenido de fármaco del 95 al 105%.

Tabla 3. Propiedades físicas de los comprimidos

Formulación	Peso (g)	Peso CV (%)	Dureza (Kp)	Friabilidad (%)	Contenido de fármaco (%)
F1	1,115	0,280	13,092	0,985	100,952
F2	1,210	0,609	12,500	0,890	99,001
F3	1,191	0,575	13,060	0,830	102,000
F4	1,244	0,410	13,992	0,830	104,000

3.1. Perfil de Liberación *in vitro* y cinética de liberación

La liberación *in vitro* de MEH se evaluó en fluido gástrico simulado a temperatura corporal (37,0 °C) (**Figura 1a**). Los perfiles mostraron dos patrones de liberación, las formulaciones F1 y F3 permiten una liberación del 80 a 90% a las 8 y 10 h. Las formulaciones F2 y F4 mostraron una liberación más lenta de MEH, hasta alcanzar valores entre 70 y 90% a las 24 h.

Se observó que en las formulaciones F2 y F4 los % de fármaco liberado se encontraron dentro de los límites de aceptación en los tiempos específicos para comprimidos de liberación prolongada de acuerdo a la USP y cumplen con la prueba de disolución (**Figura 1b**), por lo que dichas formulaciones pueden ser empleadas como plataforma para la liberación prolongada de Metformina. Al evaluar el efecto de los factores de estudio en el % máximo liberado

(Figura 1c y d) se observó que los tres factores de estudio pueden reducir la liberación del fármaco. Las formulaciones F2 y F4 que contienen un alto porcentaje de HPMC tienen una duración mayor que las formulaciones 1 y 3 en las que el porcentaje de HPMC es menor, debido a la barrera física de la capa gel que se obtiene por el HPMC al entrar en contacto con el medio de prueba [15]. Por otro lado, la arcilla MMT tuvo un impacto en el porcentaje de liberación con respecto al tiempo, lo cual se observó en las formulaciones F3 y F4 que tienen una liberación más lenta. Diversas arcillas han sido estudiadas en la preparación de materiales compuestos y sistemas de liberación de fármacos como caolinita, hidrotalcita, brucita, laponita, etc. Sin embargo, la MMT se ha vuelto prominente entre otras arcillas debido a sus diversas propiedades, abundancia, inocuidad al medio ambiente y química bien estudiada. La MMT se ha reportado en la obtención de formas farmacéuticas como agente emulsificante, espesante, agente suspensor y gelificante, además en tabletas como agente desintegrante debido a su capacidad de hinchamiento, permitiendo una liberación superior al 70% en 30 min [16]. Sin embargo al estudiar el efecto de la MMT en el perfil de liberación (Figura 1c) se observó que al aumentar la proporción de MMT disminuyó el fármaco liberado, lo cual se puede deber a que la presencia de MMT mejoró de las propiedades de barrera mediante el incremento en la tortuosidad, debido a la creación de un camino tortuoso por la presencia de las láminas características que forman la estructura de la arcilla, lo cual retarda la difusión de moléculas de fármaco desde el interior y así mismo disminuye la penetración o absorción del medio disolvente [17]. Por tanto, la combinación de un alto porcentaje de HPMC y MMT ralentizó la liberación del fármaco, además se ha reportado previamente que la presencia de HPMC permite la formación de estructura tipo gel de la MMT favoreciendo la liberación prolongada [13]. Finalmente el BS también tuvo un efecto al disminuir el % liberados, debido a que un exceso de gas puede obstruir los canales de difusión dentro de la matriz disminuyendo así la velocidad de liberación [18].

Se evaluó la cinética de liberación mediante diversos modelos matemáticos (Tabla 4), los valores más altos de R^2 y R^2 ajustados fueron con el modelo de Korsmeyer-Peppas. Se observó que las formulaciones F1 ($n=0,447$ KKP= 48,418) y F3 ($n=0,446$ KKP=49,375) presentan valores de n que corresponden a una liberación mediante difusión tipo Fick ($n \leq 0.45$), mientras que las formulaciones F2 ($n=0,471$ KKP= 29,941) y F4 ($n=0,567$ KKP=28,028) presentan valores de n entre 0.45 y 0.89, esto sugiere que el mecanismo de liberación principal es no Fickiano, es decir es una combinación entre difusión y erosión [19].

Tabla 4. Valores de R^2 y R^2 adj. de modelos de liberación de formulación

Formulación		Orden cero	Primer Orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell	Hopfen-berg
F1	R^2	-1.4751	0.7962	0.5462	0.9712	0.6092	0.7961
	R^2 adj	-1.4751	0.7962	0.5462	0.9425	0.6092	0,7554
F2	R^2	-1.2360	0.7974	0.6092	0.9952	0.6401	0.7972
	R^2 adj	-1.2360	0.7974	0.6092	0.9903	0.6401	0.7718
F3	R^2	-2.0667	0.5504	0.3733	0.9883	0.2737	0.5502
	R^2 adj	-2.0667	0.5504	0.3733	0.9765	0.2737	0.4377
F4	R^2	-0.9144	0.9046	0.6694	0.9896	0.7754	0.9045
	R^2 adj	-0.9144	0.9046	0.6694	0.9861	0.7754	0.8926

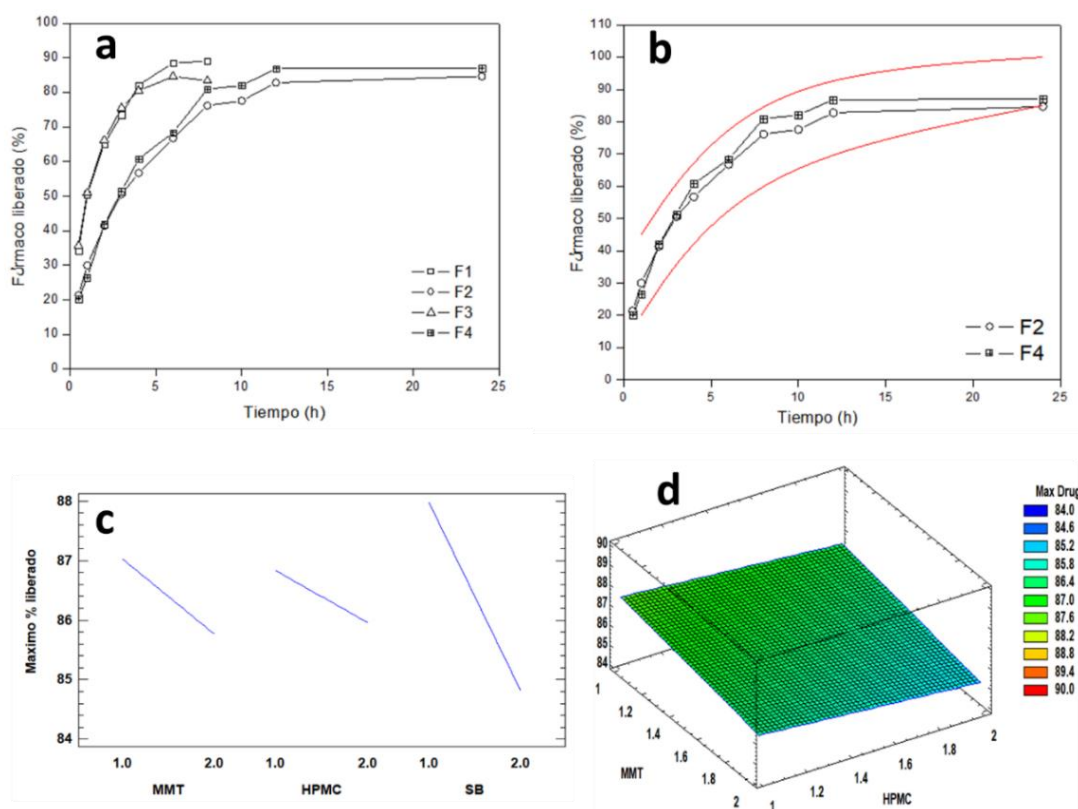


Figura 1 (a) Gráfica de perfiles de disolución de las formulaciones, (b) Perfiles de liberación que cumplen con especificaciones de liberación prolongada de MEH, (c) Gráfica de efectos principales sobre el % máximo liberado, (d) Gráfica de superficie de respuesta estimada para % máximo liberado.

3.2. Índices de hinchamiento-erosión y propiedades de flotación *in vitro*

La **tabla 5** muestra los resultados de la evaluación de tiempo de flotación (h). Todas las formulaciones mostraron capacidad de flotación lo que puede atribuirse al efecto del NaHCO_3 , debido a que se ha reportado que en los sistemas flotantes efervescentes, el bicarbonato de sodio mejora la flotabilidad de los comprimidos, especialmente en combinación con polímeros hidrofílicos como el HPMC, ya que el gas que se genera al quedar atrapado dentro del gel se forma por la hidratación del polímero, disminuyendo la densidad de la tableta aumentando así su capacidad de flotación en el estómago [18, 20]. Sin embargo, sólo las formulaciones 2 y 4 presentaron un tiempo total de flotación de hasta 24 horas.

Tabla 5. Propiedades físicas de los comprimidos

Formulación	Tiempo de retraso de flotación (min)	Tiempo total de flotación (h)
F1	16,6 h $\pm$ 0,12	10
F2	14,9 h $\pm$ 0,32	24
F3	14,8 h $\pm$ 0,32	8
F4	18,0 h $\pm$ 0,28	24

3.3. Índice de hinchamiento y erosión

La **Fig. 2** presenta el perfil de hinchamiento y erosión de cada formulación en función del tiempo de estudio. En cuanto al índice de hinchamientos (**Figura 2c**) las formulaciones presentaron los valores máximos en el siguiente orden $F4 > F2 > F1 > F3$, mientras que presento un orden inverso para el índice de erosión $F3 > F1 > F2 > F4$ (**Figura 2d**).

La formulación F3 no presentó hinchamiento y por consiguiente la erosión aumenta rápidamente hasta un 92,72% a las 4 horas. De forma similar la F1 presentó un ligero hinchamiento hasta las 4 horas y posteriormente se erosiona casi por completo a las 8 h. Las formulaciones F3 y F1 al tener el nivel bajo de HPMC no se logró estabilizar la estructura gel con la arcilla, lo cual favoreció el fenómeno de erosión sobre el de hinchamiento.

En la formulación 2, en la que se percibe que el hinchamiento aumenta rápidamente hasta las 4 horas, seguido de un periodo de hinchamiento lento de sólo el 1,73% en un periodo de 4 horas. Las curvas de hinchamiento y erosión se cruzan en el punto de tiempo entre 6 y 10 horas, a partir del segundo punto se presenta un incremento del 26,61% en el índice de hinchamiento alcanzando su máximo porcentaje. Sin embargo, la pérdida de masa se produce durante todo el proceso llegando hasta un 83,45% de erosión en 12 horas.

En la formulación 4 existe un alto grado de hinchamiento (108%), así como un menor porcentaje de erosión en comparación con las otras formulaciones, esto se debe a la presencia de un alto contenido de HPMC y la combinación con un nivel alto de MMT que permite formar una estructura tridimensional que limita la erosión [13]. Los fenómenos de hinchamiento y erosión son complejos, pero mediante diseño de experimentos pueden ser abordados, por lo que este estudio abre un panorama en el que se puede estudiar el comportamiento *in vitro* en nuevas proporciones para evaluar el impacto de la arcilla en la formación de la red tridimensional, así como evaluar el efecto de las cargas eléctricas en ambos procesos empleando polímeros catiónicos.

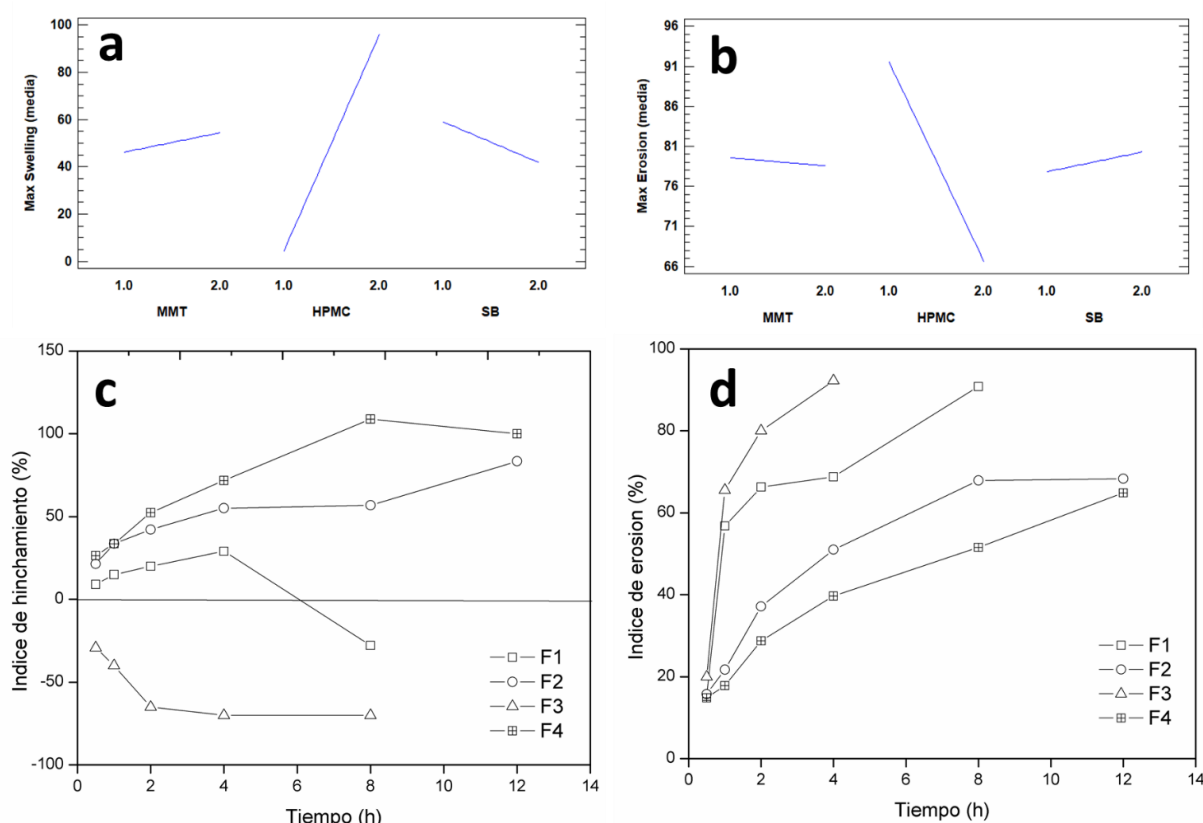


Figura 2 (a) Gráfica de efectos principales sobre el % máximo de hinchamiento, (b) Gráfica de efectos principales sobre el % máximo de erosión, (c) Grafica de Índice de hinchamiento (%)o de las formulaciones , (d) Grafica de Índice de erosión (%)o de las formulaciones

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro formulaciones de comprimidos flotantes efervescentes que mantuvieron la liberación prolongada de 8 a 24 horas. Las formulaciones F2 y F4 cumplen con los criterios de aceptación para la liberación prolongada de acuerdo a los criterios de la USP. La combinación de arcilla Montmorillonita y HPMC tuvo un impacto significativo las propiedades estructurales y de barrera (tortuosidad) para controlar la liberación del fármaco modelo. Todas las formulaciones siguieron el modelo cinético de Korsmeyer-Peppas en el que la liberación del fármaco depende de la proporción empleada en la combinación de polímero y arcilla y su capacidad para estabilizar la estructura del gel.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores manifestamos no presentar ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. H.W. Huh, Y.-G. Na, H.C. Kang, M. Kim, M. Han, T.M.A. Pham, H. Lee, J.-S. Baek, H.-K. Lee & C.-W. Cho. Novel self-floating tablet for enhanced oral bioavailability of metformin based on cellulose. *Int. J. Pharm.*, **592**, 120113 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120113>
2. L. Fitriani, R. Abdillah & E.S. Ben. Formulation of Metformin HCl floating tablet using HPC, HPMC K100M, and the combinations. *J. Sains Farm. Klin.*, **4**(1), 79–82 (2017). URL: <https://jsfk.ffarmasi.unand.ac.id/index.php/jsfk/issue/view/7>
3. M.A. El Nabarawi, M.H. Teaima, R.A.A. El-Monem, N.A. El Nabarawy & D.A. Gaber. Formulation, release characteristics, and bioavailability study of gastroretentive floating matrix tablet and floating raft system of Mebeverine HCl. *Drug Design Develop. Ther.*, **11**, 1081–1093 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2147/dddt.s131936>
4. S. Jayrajsinh, G. Shankar, Y.K. Agrawal & L. Bakre. Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **39**, 200-209 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.023>
5. C.I. Idumah, U.C. Okonkwo & C.M. Obele. Recently emerging advancements in montmorillonite polymeric nanoarchitectures and applications. *Clean. Mater.*, **4**, 100071 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clema.2022.100071>
6. K. Someshwar, K. Chithaluru, T. Ramarao & K.K. Kumar. Formulation and evaluation of effervescent floating tablets of tizanidine hydrochloride. *Acta Pharm.*, **61**(2), 217–226 (2011). Doi: <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0015-5>
7. X. Yin, H. Li, Z. Guo, L. Wu, F. Chen, M.d. Matas, Q. Shao, T. Xiao, P. York, Y. He & J. Zhang. Quantification of swelling and erosion in the controlled release of a poorly water-soluble drug using synchrotron X-ray computed microtomography. *AAPS J.*, **15**(4), 1025–1034 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9498-y>
8. M. Rahamathulla, S.M. Alsahhrani, A. Al Saqr, A. Alshetaili & F. Shakeel. Effervescent floating matrix tablets of a novel anti-cancer drug neratinib for breast cancer treatment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **66**, 102788 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102788>
9. M. Djebbar, N. Chaffai & F. Bouchal. Development of floating tablets of metformin HCl by thermoplastic granulation. Part II: *In vitro* evaluation of the combined effect of acacia Gum/HPMC on biopharmaceutical performances. *Adv. Pharm. Bull.*, **10**(3), 399–407 (2020). Doi: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.048>

10. B. Kim, Y. Byun & E.H. Lee. DoE-based design of a simple but efficient preparation method for a non-effervescent gastro-retentive floating tablet containing metformin HCl. *Pharmaceutics*, **13**(8), 1225 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081225>
11. S.N. Sapavatu & R.K. Jadi. Formulation development and characterization of gastroretentive drug delivery systems of loratadine. *Int. J. Appl. Pharm.*, **11**(6), 91–99 (2019). Doi: <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i6.35194>
12. J.A. Alkrad, R.A. Shmeis, I. Alshwabkeh, H. Abazid & M.A. Mohammad. Investigation of the potential application of sodium bentonite as an excipient in formulation of sustained release tablets. *Asian J. Pharm. Sci.*, **12**(3), 259–265 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.01.004>
13. R.M. Kaoud, A.H. Khalaf & J.A. Alkrad. Development of sustained release alogliptin tablets using a multiparticulates system made of bentonite. *Int. J. Appl. Pharm.*, **13**(3), 68–73 (2021). Doi: <https://doi.org/10.22159/ijap.2021v13i3.40664>
14. S. Choiri & A. Ainurofiq. Understanding the drug release mechanism from a montmorillonite matrix and its binary mixture with a hydrophilic polymer using a compartmental modelling approach. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, **333**(1), 012065 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/333/1/012065>
15. E. Moussa, F. Siepmann, M.P. Flament, Y. Benzine, F. Penz, J. Siepmann & Y. Karrouit. Controlled release tablets based on HPMC:lactose blends. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **52**, 607–617 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.028>
16. P. Okolo, S. Omonmhenle, A. Abdulsalaam & C. Ofunne. Novel applications of locally sourced montmorillonite (MMT) clay as a disintegrant in the formulation of pharmaceutical product. *Bayero J. Pure Appl. Sci.*, **8**(1), 153–159 (2015). Doi: <https://doi.org/10.4314/bajopas.v8i1.27>
17. S.L. Bee, M.A.A. Abdullah, S.T. Bee, L.T. Sin & A.R. Rahmat. Polymer nanocomposites based on silylated-montmorillonite: A review. *Prog. Polym. Sci.*, **85**, 57–82 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.003>
18. P. Thapa & S.H. Jeong. Effects of formulation and process variables on gastroretentive floating tablets with a high-dose soluble drug and experimental design approach. *Pharmaceutics*, **10**(3), 161 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030161>
19. K.H. Ramteke, P.A. Dighe, A.R. Kharat & S.V. Patil. Mathematical models of drug dissolution: A review. *Scholars Acad. J. Pharm.*, **3**(5), 388–396 (2014). URL: <https://saspublishers.com/media/articles/SAJP35388-396.pdf>
20. J. Ji, X. He, X.-L. Yang, W.-J. Du, C.-L. Cui, L. Wang, X. Wang, C.-F. Zhang & C.-R. Guo. The *in vitro/vivo* evaluation of prepared gastric floating tablets of berberine hydrochloride. *AAPS PharmSciTech*, **18**(6), 2149–2156 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0696-7>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

P. García-Guzmán, L. Ortega-Almanza, L. Schifter-Aceves & E. Solís-Candelas. Desarrollo y caracterización de un comprimido flotante a base de arcilla Montmorillonita y HPMC para liberación prolongada. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 248–258 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119558>

Análisis costo-beneficio de las vacunas para COVID-19 en Colombia

Rafael Niño Castro¹, Brandon Stiven Arcos Gomez², Andrea Franco Sierra^{1*} & Diego Restrepo¹

¹ Área de Economía de la Salud, Invalue Health Solutions, Cl. 23 #68-50, 8-604, Bogotá D. C., Colombia

² Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Av. Cra. 30 # 45-03, Bogotá D. C., Colombia

*Autor de correspondencia: andrea.franco@invaluehs.com

Recibido: 18 de junio de 2024

Corregido: 4 de febrero de 2025

Aceptado: 11 de febrero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115040>

RESUMEN

Introducción: Se realizó un estudio costo-beneficio en donde se estimó el impacto en la productividad debido a la introducción de las vacunas COVID-19 en el año 2021 en Colombia. **Métodos:** Se simuló un escenario de no vacunación al retirar la protección de las vacunas administradas. Se desarrolló un modelo en Excel mediante un árbol de decisión para evaluar los escenarios desde la perspectiva de la sociedad. Las entradas de efectividad y de costos se obtuvieron de literatura, y fueron valoradas mediante el manual tarifario ISS 2001 + 30%. **Resultados:** Los escenarios propuestos evalúan la productividad por mortalidad prematura e incapacidad laboral, y el costo médico. Los resultados del modelo indican que los años de productividad ganados debido al escenario con vacunación fueron de 16.586, el costo médico evitado fue de COP 3,598 billones (749.583 USD; 1 USD 0 4.800COP), el costo de productividad perdida fue de COP 352,48 mil millones (73.334 USD). **Conclusión:** el Informe de Coyuntura Económica Regional (ICER) obtenido fue 10,21 y el beneficio neto fue de COP 3.246 billones (676.250 USD) desde la perspectiva de la sociedad.

Palabras clave: Análisis Costo Beneficio; Vacunas COVID-19; Colombia.

SUMMARY

Cost-benefit analysis of COVID-19 vaccines in Colombia

Introduction: A cost-benefit study was conducted to estimate the impact on productivity due to the introduction of COVID-19 vaccines in 2021 in Colombia. **Methods:** A non-vaccination scenario was simulated by withdrawing protection from the administered vaccines. An Excel model was developed using a decision tree to evaluate the scenarios from a societal perspective. Effectiveness and cost inputs were obtained from the literature and assessed using the ISS 2001 + 30% tariff manual. **Results:** The proposed scenarios evaluate productivity due to premature mortality and work disability, and medical costs. The model results indicate that the years of productivity gained due to the vaccination scenario were 16,586, the avoided medical costs were COP 3.598 trillion (USD 749,583; USD 1 0 COP 4,800), and the cost of lost productivity was COP 352.48 billion (USD 73,334). **Conclusion:** The Regional Economic

Situation Report (RESP) obtained was 10.21, and the net benefit was COP 3.246 trillion (USD 676,250) from a societal perspective.

Keywords: Cost-Benefit Analysis; COVID-19 Vaccines; Colombia.

RESUMO

Análise de custo-benefício das vacinas contra a COVID-19 na Colômbia

Introdução: Um estudo de custo-benefício foi conduzido para estimar o impacto na produtividade devido à introdução das vacinas contra a COVID-19 em 2021 na Colômbia. **Métodos:** Foi simulado um cenário de não vacinação retirando a proteção das vacinas administradas. Um modelo de árvore de decisão foi desenvolvido no Excel para avaliar os cenários de uma perspectiva social. Os dados de eficácia e custo foram obtidos da literatura e avaliados utilizando o manual tarifário ISS 2001 + 30%. **Resultados:** Os cenários propostos avaliam a produtividade devido à mortalidade prematura e incapacidade para o trabalho, e os custos médicos. Os resultados do modelo indicam que os anos de produtividade ganhos devido ao cenário de vacinação foram de 16.586, o custo médico evitado foi de COP 3,598 trilhões (US\$ 749.583; US\$ 10 COP 4.800) e o custo de produtividade perdida foi de COP 352,48 bilhões (US\$ 73.334). **Conclusão:** O Relatório de Situação Econômica Regional (ICER) obtido foi de 10,21 e o benefício líquido foi de COP 3,246 trilhões (US\$ 676.250) da perspectiva da sociedade.

Palavras-chave: Análise de Custo-Benefício; Vacinas para o covid-19; Colômbia.

1. INTRODUCCIÓN

En diciembre de 2019, se detectó por primera vez un brote de neumonía en Wuhan (Hubei, China) posteriormente llamado SARS-CoV2, el cual se extendió por China continental y luego a otros países del mundo, llegando a notificarse, para el 17 de febrero de 2020, cerca de 70.000 casos confirmados en todo el mundo [1]. Posteriormente, la OMS declaró pandemia por COVID-19 el 11 de marzo de 2020 e instó a los países a tomar acciones de identificación, control, aislamiento, seguimiento y medidas de prevención de contagio [2].

Los síntomas por infección de SARS-CoV2 pueden diferir según el paciente; en general, se desarrolla un cuadro agudo a moderado, sin necesidad de hospitalización con fiebre, tos, cansancio generalizado y pérdida del gusto y olfato. No obstante, en cuadros clínicos severos los pacientes experimentan dificultad para respirar, disfagia, ataxia, dolor de pecho hasta incluso pérdida de la movilidad. En consecuencia, algunos pacientes requieren hospitalizaciones para superar el cuadro de infección o en el peor de los casos el paciente requiere manejo en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) para salvar su vida; Finalmente, el paciente puede quedar recuperado sin secuelas, recuperado con secuelas o morir [3, 4].

Desde finales del año 2020 se ha avanzado a nivel mundial en la implementación de programas de vacunación contra COVID-19 debido al desarrollo de vacunas por parte de laboratorios como: Pfizer-Bio-Ntech (vacuna Pfizer), Oxford-AstraZeneca (vacuna AstraZeneca), Moderna (vacuna Moderna, vacuna ARNm-1273), Janssen (vacuna Janssen, vacuna JNJ-78436735) y SINOVAR (vacuna CoronaVac). En Colombia, la vacunación masiva contra el COVID-19 comenzó en febrero de 2021 en el marco del Plan Nacional de Vacunación adoptado mediante el Decreto 109 de 2021 y modificado por los Decretos 404, 466, 630, 744 y 1671 de 2021. Este plan se dividió en dos fases, y cinco etapas [5]. La primera fase incluyó las etapas 1, 2 y 3; donde su principal objetivo fue reducir la morbilidad y el número de casos graves que requieren una asistencia sanitaria más compleja. Posteriormente, continuaron las Fases 4

y 5, cuyo objetivo fue proteger a la población general y reducir la transmisión comunitaria del virus.

El Ministerio de Salud y Protección Social, ente rector del sistema de salud y responsable del diseño, seguimiento, monitoreo y evaluación del Plan Nacional de Vacunación contra el COVID-19 en Colombia, estableció la Cohorte Esperanza, con el objetivo de evaluar y monitorear sistemáticamente el plan de vacunación en conjunto con el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). La Cohorte Esperanza estuvo constituida por todos los habitantes del territorio colombiano, los cuales hacen parte de la población objeto del Plan Nacional de Vacunación contra el COVID-19 [6]. Cabe resaltar que a nivel macroeconómico la propagación de la pandemia COVID-19, conllevó a Colombia a finales de marzo de 2020 a establecer cuarentenas en todo el país, con el objetivo de mitigar el contagio y minimizar las muertes causadas por la pandemia [7, 8]. Las medidas de distanciamiento físico, las cuarentenas y el confinamiento voluntario en población, condujo a que se redujeran las actividades de producción y comercio a nivel nacional, agravando la situación financiera de los hogares colombianos. Durante la pandemia se cerraron empresas, hubo destrucción del tejido empresarial, como también pérdida de empleos e ingresos de los trabajadores [7, 8]. Otro aspecto importante para resaltar fue la incapacidad laboral generada por el contagio de SARS-CoV2 y el tiempo de tratamiento, es decir, quien contrajo el virus dejó de trabajar al menos 7 días o murió, y a través de este hecho se puede establecer la pérdida de productividad. En consecuencia, las vacunas contra la COVID-19 pretenden disminuir el riesgo de morbilidad, disminuir la severidad de la enfermedad, reducir los eventos por hospitalización y reducir los eventos de muerte [9]. Este estudio costo-beneficio tiene como objetivo determinar la razón costo-beneficio de introducir las vacunas COVID-19 y el impacto en la productividad para la sociedad en Colombia para el año 2021.

2. METODOLOGÍA

2.1. Modelo

Para el estudio de costo-beneficio se desarrolló un modelo de árbol de decisión en Microsoft Excel®, el cual permite modelar una enfermedad transmisible no crónica que se auto resuelve en un plazo menor a un año, en la cual las intervenciones médicas prolongan la vida o mitigan la carga de síntomas de la enfermedad. El modelo propuesto plantea un escenario con vacunación (escenario de referencia) y un escenario sin vacunación, en el cual se retira el efecto protector de las vacunas (Ver Figura 1).

Las vacunas incluidas en el análisis fueron las aprobadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) [10]: Pfizer-Biontech [11], Astrazeneca [12], Janssen [13], Coronavac-Sinovac [14] y Moderna [15], cuya efectividad fue obtenida de una revisión Cochrane de efectividad y seguridad [16]. El modelo incorpora las probabilidades de ser un paciente vacunado que muere o sobrevive después de haber cursado la enfermedad; pudiendo recibir diferentes tratamientos según la severidad de esta (paciente sintomático, sintomático UCI y no sintomático). Se consideró un horizonte temporal de 1 año, desde el 17 de abril de 2021 hasta el 17 de abril de 2022, dado que se tiene registro de datos en esta temporalidad y ajustar la simulación para estimar la productividad e incapacidades generadas en este año, empleando el PIB per cápita reportado por el DANE [17] como referencia de la productividad anual de un colombiano. No se empleó tasa de descuento, ni ajustes por inflación debido al horizonte temporal utilizado.

Se incluyeron los siguientes desenlaces: 1) Número de muertes por causa directa a COVID-19. 2) Años potencialmente perdidos por muerte prematura (AVP). 3) Años de vida por incapacidad (AVI) y 4) Años perdidos de productividad (AVP + AVI). Para los AVP se tomó la cantidad de muertes observadas en cada escenario, es decir, una persona fallecida aporta solo un año de pérdida de productividad por muerte.

Se incorporaron los costos relacionados con la vacunación (costo de adquisición por dosis vacuna + costo por dosis de la vacuna + costo de la prueba confirmatoria de SARS-CoV2 (solo aplica para pacientes sintomáticos)). No se consideró el transporte de las vacunas y el costo médico por tratamiento que puede variar según la severidad de la enfermedad. En el escenario sin vacunación, no se asumieron los costos de adquisición ni el costo de administración de las vacunas.

Finalmente, para hallar el costo de la productividad ganada en cada escenario se procedió a multiplicar los años perdidos de productividad por un PIB per Cápita del año 2021, luego se procedió a calcular la razón de costo-beneficio incremental teniendo en cuenta los costos médicos de cada escenario. La interpretación del Informe de Coyuntura Económica Regional (ICER) permite conocer el aumento en productividad por cada peso invertido en costo médico directo.

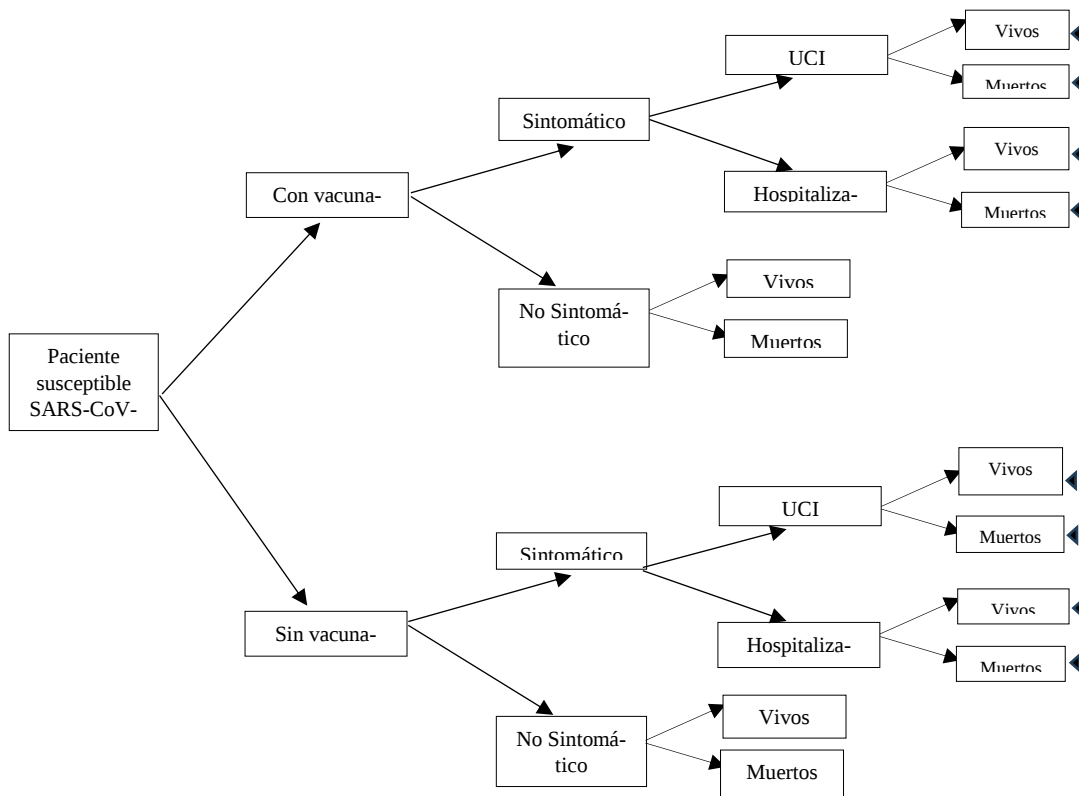


Fig. 1. Modelo Árbol de Decisión.

2.1.1. Entradas del modelo

2.1.1.1. Datos demográficos y datos de la enfermedad

La población objetivo se estimó partir del registro del programa de vacunación COVID-19 y los protocolos de vacunación [9, 5, 17, 18] en el periodo de estudio. Los datos de la población, los porcentajes de vacunación con cada vacuna y la cantidad de dosis aplicadas por esquema

de vacunación fueron obtenidos de fuentes de datos públicas [19, 20]. La razón de tasas de mortalidad y de hospitalización fueron obtenidas de los informes técnicos de la Cohorte Esperanza [6, 21, 22], mientras que el porcentaje de población no sintomática, porcentaje de mortalidad en UCI, la mortalidad en hospitalización y la mortalidad no sintomática, fueron obtenidos de literatura [23, 24]. Los días de incapacidad fueron tomados de la Circular Conjunta 004 de 2022 [9] y la Resolución 914 de 2020 [25]. En la tabla 1, se observan los parámetros del caso base.

Tabla 1. Parámetros del caso base.

Variable	Caso base	Valor mínimo	Valor máximo	Fuente
Población Vacunada	35.000.000	33.250.000	36.750.000	Autores [22]
% Pob. Vacunada Pfizer-Bio-Ntech	28%	26,8%	29,6%	[23]
% Pob. Vacunada Oxford-AstraZeneca	14%	13,7%	15,1%	[23]
% Pob. Vacunada Moderna	20%	19,4%	21,4%	[23]
% Pob. Vacunada Jnj-78436735 De Janssen	10%	9,8%	10,8%	[23]
% Pob. Vacunada CoronaVac	27%	25,4%	28,0%	[23]
% Pob. con 1ra Dosis	51%	48,9%	54,0%	[23]
% Pob. Con 2da Dosis	34%	32,5%	35,9%	[23]
% Pob. Dosis Refuerzo	14%	13,7%	15,1%	[23]
Relación Tasas Hospitalización*	2	1,86	2,05	[24-26]
Relación Tasa Mortalidad*	2	1,96	2,16	[24-26]
% Pob. No Sintomática	65%	61,7%	68,2%	[27]
% Mortalidad UCI	46%	43,9%	48,5%	[27]
% Mortalidad Hospitalización	33%	31,6%	35,0%	[28]
% Mortalidad No Sintomática	2%	1,8%	2,0%	[28]
% Protección Pfizer-Bio-Antich	95,0%	90,3%	99,8%	[29]
% Protección Oxford-AstraZeneca	62,1%	59,0%	65,2%	[29]
% Protección Moderna	94,1%	89,4%	98,8%	[29]
% Protección Jnj-78436735 De Janssen	66,1%	62,8%	69,4%	[29]
% Protección CoronaVac	67,0%	63,7%	70,4%	[29]
Tasa de fallecidos Vacunados	0,2%	0,2%	0,2%	[24-26]
Tasa de fallecidos No Vacunados	2,0%	1,9%	2,1%	[24-26]
Tasa de hospitalización vacunados	0,7%	0,7%	0,8%	[24-26]
Tasa de hospitalización NO Vacunados	2,5%	2,3%	2,6%	[24-26]
Días de incapacidad población no sintomática	7	6,9	7,6	[14]
Días de incapacidad Población sintomática UCI	21	20,0	22,1	[14]
Días de incapacidad Población sintomática Hospitalización	14	13,3	14,7	[15]
Costo Vacuna Pfizer-Bio-Antich	\$ 44.655	\$ 42.422	\$ 46.888	[30]
Costo Vacuna Oxford-AstraZeneca	\$ 22.327	\$ 21.210	\$ 23.443	[30]
Costo Vacuna Moderna	\$ 86.202	\$ 81.892	\$ 90.512	[30]
Costo vacuna Janssen	\$ 34.112	\$ 32.407	\$ 35.818	[30]
Costo Vacuna CoronaVac	\$ 9.699	\$ 56.714	\$ 62.684	[30]
Costo día de incapacidad	\$ 59.949	\$ 56.952	\$ 62.947	Autores
Costo aplicación vacuna	\$ 94.371	\$ 89.652	\$ 99.090	[31]
Costo PIB per Cápita 2021 (COP)	\$ 22.796.648	\$ 21.656.816	\$ 23.936.481	[32]
Costo de atención asintomático	\$ 1.730.586	\$ 1.644.057	\$ 1.817.115	Autores

Costo de atención sintomático hospitalización	\$ 15.899.535	\$ 15.104.558	\$ 16.694.511	Autores
Costo de atención paciente sintomático UCI	\$ 35.732.621	\$ 33.945.990	\$ 37.519.252	Autores
Prueba confirmatoria PCR-RT	\$ 266.903	\$ 253.558	\$ 280.248	[33]

(Vacunados vs. No vacunados) *Fuente: Autores 2023

Tabla 2. Tasas de hospitalización y muerte por COVID-19 según estado de vacunación por grupos etarios. Colombia, 28 noviembre de 2021 – 08 enero de 2022.

Grupo edad	Hospitalización por COVID-19				Mortalidad por COVID-19			
	Tasa en no vacunados	Tasa en vacunados	Razón de tasas	IC 95%	Tasa en no vacunados	Tasa en vacunados	Razón de tasas	IC 95%
30-39	3	1,3	2,3	1,9-2,8	1,7	0,4	4,6	4,3-5,0
40-49	7	2,1	3,3	3,1-3,5	4,8	0,5	9,9	9,8-10,1
50-59	14,8	3,6	4,1	4,0-4,3	11,1	1,8	6	5,9-6,2
60-69	32,9	8	4,1	4,0-4,2	34,4	6,8	5,1	5,0-5,2
70-79	59,4	19	3,1	3,0-3,3	77,3	18,2	4,2	4,1-4,4
80 y más	172,1	34,8	5	4,8-5,1	274,3	51,4	5,3	5,3-5,4

Fuente: Cohorte Esperanza

2.1.1.2. Costos relacionados

El costo de adquisición por dosis de vacuna fue tomado del del informe al Congreso del Departamento Administrativo de la Presidencia de la República en 2022 [26]. El costo de aplicación por dosis de vacuna fue tomado de la Resolución 651 de 2021 [27] y el costo de la prueba de confirmatoria de SARS-CoV2 fue tomada de la Resolución 1630 de 2020 [28]. El costo de incapacidad fue calculado como la división del producto interno bruto del año 2021 dividido en los 365 días al año, el valor del PIB per cápita para el año 2021 fue tomado del DANE [17, 29]. La identificación y caracterización de los recursos en salud empleados en pacientes asintomáticos, sintomáticos y sintomáticos UCI fueron hallados en la guía de lineamientos para el manejo clínico de pacientes con infección por nuevo coronavirus COVID-19 [30], estos recursos en salud fueron valorados mediante el manual tarifario ISS 2001 + 30% [31] según las recomendaciones del Instituto de Evaluación en Tecnologías Sanitarias-IETS [32].

2.1.2. Salidas del Modelo

El modelo evalúa el valor monetario de los años de productividad estimando la sumatoria de los años potencialmente perdidos más los años de vida por incapacidad. Para calcular las incapacidades, se asume que una persona solo puede tener una incapacidad médica 1 vez al año por COVID 19. Una vez se conocen los años de productividad perdidos, se multiplica por un PIB per cápita de 2021 para determinar el valor de la productividad asociada. Además, el modelo calcula los costos médicos de la atención hospitalaria de los casos sintomáticos.

2.2. Análisis de sensibilidad

Se realizó un análisis de sensibilidad determinístico para establecer cuáles variables impactan más en el ICER. Además, se realizó un análisis de sensibilidad probabilística de 1000 iteraciones. Para parámetros como tasas y probabilidades de ocurrencia se empleó una distribución beta, para los parámetros de costos se empleó una distribución gamma, y para el resto de las variables, se empleó una distribución normal.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados del caso base

Se determinó que el escenario con mayor costo médico fue aquel sin vacunación con COP 5,02 Billones en comparación con el escenario con vacunación que tuvo un costo esperado de COP 1,42 Billones (ver tabla 3). Los resultados clínicos determinaron que se espera mayor cantidad de años productivos perdidos por muerte prematura en el escenario sin vacunación, en comparación con el escenario de vacunación (3.918 vs. 123); de igual forma, los años perdidos por incapacidad fueron mayores en el escenario sin vacunación (17.462 vs. 5.149). Los años de productividad perdidos fueron mayores en el escenario sin vacunación en comparación con el escenario con vacunación (21.380 vs. 5.271). Los años de productividad evitados debido al escenario con vacunación fueron 16.109, el costo médico evitado fue de COP 3,59 Billones y el costo de productividad fue de COP 352,48 mil millones. Finalmente, el ICER obtenido fue -10,21, es decir que, por cada COP ahorrado en costo médico, el valor monetario de la productividad ganada fue de COP \$1. De igual forma, las diferencia entre los beneficios y costos basados en la metodología de beneficio neto fueron de COP 3,2 Billones a favor de la vacunación. El escenario con vacunación domina al escenario sin vacunación.

Tabla 3. Resultados del caso base

Alternativa	Escenario con vacunación	Escenario sin vacunación
Costo sanitario	COP 1.426.476.294.249	COP 5.025.455.690.067
Muertes año	123	3.918
Años de incapacidad	5.149	17.462
Años de productividad perdidos	5.271	21.380
Costo productividad	COP 115.346.259.909	COP 467.835.465.930
Años de productividad ganados	16.109	
Costo médico incremental	COP 3.598.979.395.818	
Costo productividad ganada incremental	-COP 352.489.206.020	
ICER	-10,21	

Fuente: Autores 2023.

3.2. Análisis de sensibilidad

Los resultados del análisis de sensibilidad se observan en las Fig. 2 y 3. En el diagrama de tornado se observó que las variables que más afectaron el modelo fueron, de mayor a menor impacto: el porcentaje de población no sintomática, porcentaje de mortalidad UCI y el costo de atención paciente UCI; en la Fig. 2, se observan las 14 variables que más impactan el modelo. En la Fig. 3, se observa el plano de costo-beneficio incremental de las 1000 iteraciones; aquí se observa que la nube de puntos hallada genera mayores costos médicos evitados y genera mayores costos de productividad ganados en el 100% de las simulaciones realizadas.

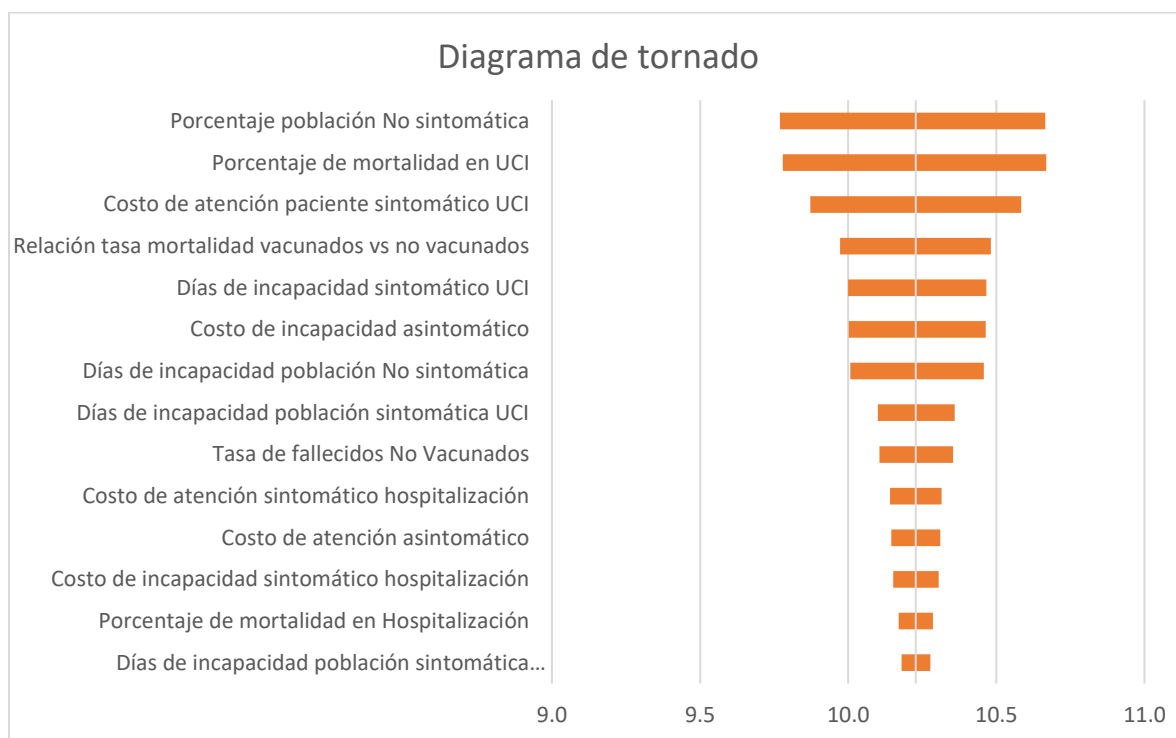


Fig. 2. Diagrama de tornado.

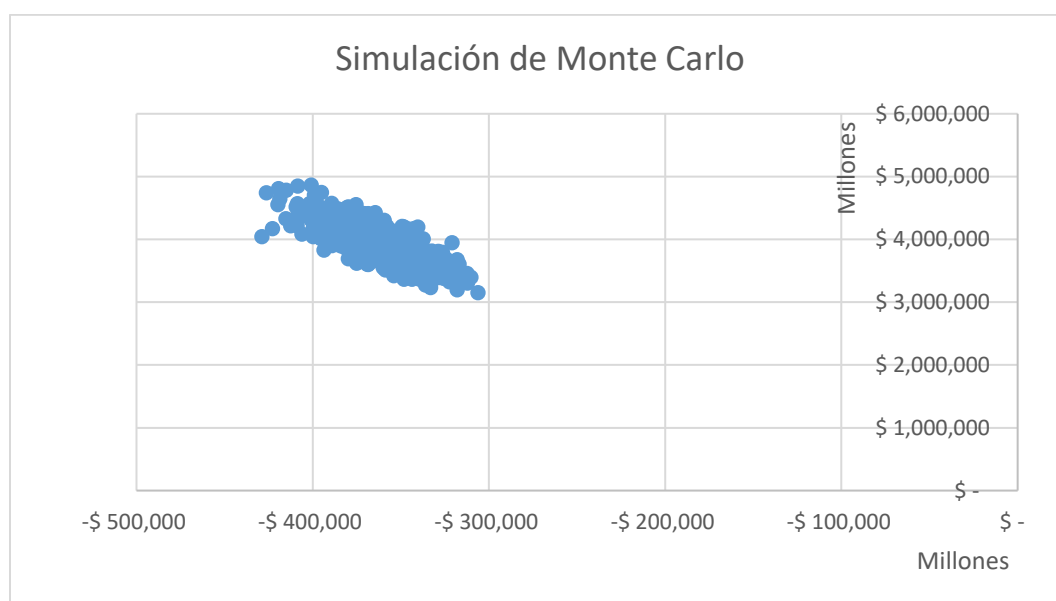


Fig. 3. Plano costo beneficio incremental.

4. DISCUSIÓN

Los resultados determinaron que la introducción de las vacunas COVID-19 a Colombia en el año 2021 generaron un ahorro potencial de COP 352.489.206.020 en productividad y un costo médico evitado de COP 3.598.979.395.818 desde la perspectiva de la sociedad, los cuales, son consistentes con la literatura publicada. Un estudio de impacto presupuestal realizado por Taborda *et al.* [33], determinó que la introducción de las vacunas COVID-19 en países de Latinoamérica generaría un ahorro potencial entre 100 -1500 millones de pesos de costos médicos

directos desde la perspectiva del tercer pagador; por su parte, un estudio costo beneficio de Reino Unido en el año 2021 [34, 35] determinó que la introducción de la vacunas COVID-19 generaría un esfuerzo financiero en dólares entre \$17.6 billones - \$4899 billones para el sistema de salud Reino Unido; un estudio costo-beneficio de los autores López *et al.* [36] determinó un ICER de 3,3 desde la perspectiva de la sociedad y un estudio costo-beneficio canadiense [37] determinó que la introducción de las vacunas COVID-19 generaría un ahorro potencial de costos de productividad de CAD \$222 billones (161.773.620.000 USD) desde la perspectiva de la sociedad.

Las vacunas COVID-19 a nivel mundial son consideradas como la estrategia más recomendada para mitigar el impacto de la Morbi-mortalidad por SARS-CoV2 [38]; sin embargo, es importante considerar que las acciones sociales tomadas por el gobierno de Colombia [39, 40], como el aislamiento voluntario, las cuarentenas obligatorias y las acciones de prevención y mitigación de contagio, pueden modificar el resultado del estudio, por lo cual la pérdida de productividad en el escenario sin vacunación puede ser mayor a lo simulado.

Por otro lado, existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de información dado que las bases de datos empleadas son de manejo público en su mayoría, información sensible al reporte por asegurador o prestador. Los valores de los días de incapacidad fueron tomados de referencias públicas, sin embargo, estos pueden ser mayores a los reportados; el presente estudio no tuvo en cuenta los gastos de inversión en estructuras, infraestructuras e insumos médicos y contratación de personal calificado para la gestión antes y después de la administración de las vacunas, ni el gasto de bolsillo de la población que recibió manejo no hospitalario. La mayoría de las fuentes de efectividad fueron tomadas del reporte de la Cohorte Esperanza, mientras que la fuente de costo de adquisición de las vacunas fue tomada del informe del DAPRE y la calidad de los reportes no fue evaluada.

5. CONCLUSIONES

La introducción de las vacunas COVID-19 en Colombia en el año 2021, generó ahorro de costos médicos directos y ganancia en productividad, generando beneficios para la sociedad.

La introducción de las vacunas COVID-19 en Colombia en el año 2021, generaría un costo de productividad ganada de COP 352.489.206.020 (73.435 USD (31)) y un costo médico evitado de COP 3.598.979.395.818 desde la perspectiva de la sociedad (749.787 USD). El ICER obtenido fue 10,21. El beneficio neto (37) fue de COP 3.246 Billones (676.250 USD).

El análisis determinístico indicó que las variables que más afectan el modelo son el porcentaje de población no sintomática, porcentaje de mortalidad UCI y el costo de atención paciente UCI.

El análisis probabilístico indicó que el escenario con vacunación generaría resultados dominantes a favor de la vacunación con costos médicos evitados y costos de pérdida de productividad evitados en todas las iteraciones evaluadas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue desarrollado con los aportes económicos de la organización Invalue Health Solutions, SAS.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno de los autores tiene conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Z. Zheng, F. Peng, B. Xu, J. Zhao, H. Liu, J. Peng, *et al.* Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J. Infect.*, **81**(2), e16–e25 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.021>
2. Organización Panamericana de la Salud. *La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia*. URL: <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia>. Accesado el 19 de septiembre de 2023.
3. Organización Mundial de la Salud. Vías de transmisión del virus de la COVID-19: repercusiones para las recomendaciones relativas a las precauciones en materia de prevención y control de las infecciones. URL: <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>. Accesado el 19 de septiembre de 2023.
4. J.C. Santos-Fuentes, V. Verano-Asiain, R.G. Olguín-Hernández, J.C. Ruvalcaba-Ledezma, S.Y. Cortés-Ascencio, J. Reynoso-Vázquez, L. López-Contreras & M.d.C.A. Hernández-Ceruelos. Sintomatología y factores de riesgo presentes en la enfermedad por SARS-CoV-2. *Journal of Negative and No Positive Results*, **6**(11), 1373-1386 (2021). Doi: <https://doi.org/10.19230/jonnpr.4172>
5. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 109 de 2021: Por el cual se adopta el Plan Nacional de Vacunación contra el COVID-19 y se dictan otras disposiciones. Bogotá D. C., 2021; 28 p. URL: <https://dapre.presidencia.gov.co/normativa/normativa/DECRETO-109-29-ENERO-2021.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
6. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Cohorte Esperanza: Reporte Técnico 01. Dirección de Epidemiología y Demografía. Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud, Bogotá D. C., 2022; 41 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/cohorte-esperanza-msps-reporte-1.pdf>
7. L. Lu, W. Zhong, Z. Bian, Z. Li, K. Zhang, B. Liang, *et al.* A comparison of mortality-related risk factors of COVID-19, SARS, and MERS: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, **81**(4), e18–e25 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.002>
8. E. Abuabara-Franco, J. Bohórquez-Rivero, J. Restom-Arrieta, I. Uparella-Gulfo, J. Sáenz-López & J. Restom-Tinoco. Infección por SARS-CoV-2 y enfermedad COVID-19: revisión literaria. *Revista Salud Uninorte*, **36**(1), 196–230 (2020). Doi: <https://doi.org/10.14482/sun.36.1.616.211>
9. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Ministerio del Trabajo. Circular Conjunta No. 004 de 2022: Recomendaciones para la protección laboral durante el cuarto pico de la pandemia por SARS-CoV-2 (COVID-19). Bogotá D. C., 2022; 3 p. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Circular%20Conjunta%20No.004%20de%202022-.pdf
10. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 1787 del 2021: Por el cual se prorroga la vigencia del Decreto 1787 de 2020 que establece las condiciones sanitarias para el trámite y otorgamiento de la Autorización Sanitaria de Uso de Emergencia - ASUE para medicamentos de síntesis química y biológicos destinados al diagnóstico, la prevención y tratamiento de la COVID - 19 en vigencia de la emergencia sanitaria. Bogotá D. C., 2021; 3 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/decreto-1781-de-2021.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
11. F.P. Polack, S.J. Thomas, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.*, **383**(27), 2603–2615 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
12. M. Voysey, S.A. Costa-Clemens, S.A. Madhi, L.Y. Weckx, P.M. Folegatti, P.K. Aley, *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of

- four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*, **397**(10269), 99–111 (2021). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
13. J. Sadoff, G. Gray, A. Vandebosch, V. Cárdenas, G. Shukarev, B. Grinsztejn, *et al.* Safety and efficacy of single-dose Ad26. COV2.S vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, **384**(23), 2187–2201 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>
14. World Health Organization. Evidence Assessment: Sinovac/CoronaVac COVID-19 vaccine. Geneva, 2021; 32 p. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/sage/2021/april/5_sage29apr2021_critical-evidence_sinovac.pdf. Accesado el 6 de octubre de 2023.
15. L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, *et al.* Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.*, **384**(5), 403–416 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
16. C. Graña, L. Ghosn, T. Evrenoglou, A. Jarde, S. Minozzi, H. Bergman, *et al.* Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **12**(12), CD015477 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015477>
17. República de Colombia, DANE. Producto Interno Bruto (PIB) nacional trimestral. Bogotá D. C. URL: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/cuentas-nacionales/cuentas-nacionales-trimestrales/pib-informacion-tecnica>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
18. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos técnicos y operativos para la vacunación contra el COVID-19. Bogotá D. C., 2021; 99 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/lineamientos-tecnicos-operativos-covid19-anexos.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
19. República de Colombia, Ministerio Salud y Protección social. Plan nacional de vacunación contra el COVID-19. Bogotá D. C., 2021. URL: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/Vacunacion/Paginas/Vacunacion-covid-19.aspx>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
20. República de Colombia, Ministerio Salud y Protección social. Aplicación de dosis de vacuna contra COVID-19. Bogotá D. C. URL: <https://www.datos.gov.co/en/Salud-y-Proteccion-Social/Aplicacion-de-dosis-de-vacuna-contra-COVID-19/prrv-jnta>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
21. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Cohorte Esperanza: Reporte Técnico 02. Dirección de Epidemiología y Demografía. Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud, Bogotá D. C., 2022; 13 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/cohorte-esperanza-msps-report-2.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
22. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Cohorte Esperanza: Reporte Técnico 03. Dirección de Epidemiología y Demografía. Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud, Bogotá D. C., 2022; 13 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/cohorte-esperanza-msps-report-3.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
23. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Seguimiento de mortalidad por COVID. URL: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiNzU4ZjUwNGEtNjllhNy00NmU4LWJmYTktYTY1YTZiMGFkNjlyIiwidCI6ImJmYjdIMTNhLTdmYjctNDAxNi04MzBjLWQzNzE2ZThkZDhiOCJ9>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
24. D.R. Rodriguez-Lima, A.M. Pinzón-Rondón, C. Rubio-Ramos, D.I. Pinilla-Rojas, M.J. Niño-Orrego, M.A. Díaz-Quiroz, *et al.* Clinical characteristics and mortality associated with COVID-19 at high altitude: a cohort of 5161 patients in Bogotá, Colombia. *Int. J. Emerg. Med.*, **15**(1), 22 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12245-022-00426-4>
25. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución No. 914 de 2020: Por la cual se define la tarifa máxima o valor máximo a pagar, durante la emergencia sanitaria, por los servicios de Unidad de Cuidados Intensivos adulto, pediátrica y neonatal y de Unidad de Cuidado Intermedio adulto y pediátrica para la atención de pacientes con Coronavirus COVID-19 confirmados y se dictan otras disposiciones. Bogotá D. C., 2020; 5 p. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%20914%20de%202020.pdf. Accesado el 6 de octubre del 2023.

26. República de Colombia, Departamento Administrativo de la Presidencia de la República – DAPRE. Informe al Congreso DAPRE. Bogotá D. C., 2022. URL: <https://www.camara.gov.co/sites/default/files/2022-10/INFORME%202022%20DAPRE.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
27. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución No. 651 de 2021: Por la cual se modifican los artículos 4, 6, 7 y 8 de la Resolución 166 de 2021 y se sustituye su Anexo Técnico 1. Bogotá D. C., 2021; 17 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/Biblioteca-Digital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-651-de-2021.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
28. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1630 de 2020: Por la cual se modifican los artículos 5 y 7 de la Resolución 1463 de 2020. Bogotá D. C., 2020; 5 p. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%201630%20de%202020.pdf. Accesado el 6 de octubre del 2023.
29. República de Colombia, Banco de la República. Tasa de cambio del peso colombiano. Tasa de cambio Representativa del Mercado (TRM - Peso por dólar). Bogotá D. C. URL: <https://www.banrep.gov.co/es/estadisticas/trm>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
30. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos para el manejo clínico de pacientes con infección por nuevo coronavirus COVID-19. Bogotá D. C., 2020; 32 p. URL: <https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos%20y%20procedimientos/PSSS03.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
31. República de Colombia, Instituto de Seguros Sociales. Acuerdo No. 256 de 2.001 (19 de Diciembre) por el cual se aprueba el "Manual De Tarifas" de la Entidad Promotora de Salud del Seguro Social "EPS-ISS". Bogotá D. C., 2001. URL: <https://lexsaludcolombia.files.wordpress.com/2010/10/tarifas-iss-2001.pdf>. Accesado el 6 de octubre del 2023.
32. R. Faria & A. Mejía (editores). *Documentos técnicos de apoyo a la construcción del caso de referencia colombiano para la evaluación económica en salud*. Instituto de Evaluación Tecnológica – IETS. Bogotá D.C., 2014; 91 p. URL: <https://www.iets.org.co/Archivos/67/Documentos-tecnicos-espanol.pdf>.
33. A.R. Taborda, D.A. Murillo, C. Moreno, P.A.R. Taborda, M. Fuquen, P.A. Díaz & D. Londoño. Análisis de impacto presupuestal de la vacunación contra COVID-19 en América Latina. *Rev. Panam. Salud Pública*, **46**, e5 (2022). Doi: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.5>
34. F.G. Sandmann, N.G. Davies, A. Vassall, W.J. Edmunds & M. Jit. The potential health and economic value of SARS-CoV-2 vaccination alongside physical distancing in the UK: a transmission model-based future scenario analysis and economic evaluation. *Lancet, Infect Dis.*, **21**(7), 962-974 (2021). Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00079-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00079-7)
35. A.M. Utami, F. Rendrayani, Q.A. Khoiry, D. Noviyanti, A.A. Suwantika, M.J. Postma & N. Zakiah. Economic evaluation of COVID-19 vaccination: A systematic review. *J. Glob. Health*, **13**, 06001 (2023). Doi: <https://doi.org/10.7189/jogh.13.06001>
36. F. López, M. Català, C. Prats, O. Estrada, I. Oliva, N. Prat, *et al.* A cost-benefit analysis of COVID-19 vaccination in Catalonia. *Vaccines* (Basel), **10**(1), 59 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines10010059>
37. A.R. Tuite, V. Ng, R. Ximenes, A. Diener, E. Rafferty, N.H. Ogden & M. Tunis. Quantifying the economic gains associated with COVID-19 vaccination. *Can. Commun. Dis. Rep.*, **49**(6), 263–273 (2023). Doi: <https://doi.org/10.14745/ccdr.v49i06a03>
38. T. Barrientos-Gutiérrez, C. Alpuche-Aranda, E. Lazcano-Ponce, C. Pérez-Ferrer & J. Rivera-Dommarco. La salud pública en la primera ola: una agenda para la cooperación ante Covid-19. *Salud Pública de México*, **62**(5), 598-606 (2020). URL: <https://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v62n5/0036-3634-spm-62-05-598.pdf>
39. República de Colombia, Departamento Administrativo de la Función Pública. Decreto 457 de 2020: Por el cual se imparten instrucciones en virtud de la emergencia sanitaria generada por la pandemia del Coronavirus COVID-19 y el mantenimiento del orden público. Bogotá D. C., 2020. URL: https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma_pdf.php?i=110674. Accesado el 6 de octubre del 2023.

40. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución No. 385 del 12 de marzo de 2020: Por la cual se declara la emergencia sanitaria por causa del coronavirus COVID-19 y se adoptan medidas para hacer frente al virus. Bogotá D. C., 2020. URL: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%200385%20de%202020.pdf. Consultado el 6 de octubre del 2023.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R. Niño-Castro, B.S. Arcos-Gomez, A. Franco-Sierra & D. Restrepo. Análisis costo-beneficio de las vacunas para COVID-19 en Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 259–271 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115040>

***In-vivo* pharmacokinetics evaluation of canagliflozin self-nanomicellizing solid dispersion as oral capsules dosage forms**

Nizar Awish Jassem

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Al-Farahidi University, Baghdad, Iraq

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0338-8296>

E-mail: nazar.jassem@uoalfarahidi.edu.iq

Received: November 5, 2024

Corrected: February 4, 2025

Accepted: February 11, 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117438>

SUMMARY

Background: Self-nanomicellizing solid dispersion (SNMSD) is a method that integrates the advantages of solid dispersion with nanomicelles, enhancing the oral bioavailability of poorly water-soluble pharmaceuticals. This solid drug delivery system, when it comes into contact with GIT fluids, it forms nanomicelles. Canagliflozin (CFZ), a sodium-glucose co-transporter inhibitor, has become popular for managing type 2 diabetes. CFZ faces biopharmaceutical challenges such as poor water solubility, poor permeation, and susceptibility to P-glycoprotein mediated efflux, posing challenges for its pharmaceutical development. This study aims to compare the in-vivo pharmacokinetic parameters of CFZ in rats when prepared as SNMSD versus CFZ-suspension. **Methods:** The SNMSD formula was prepared using a solvent evaporation method using soluplus as a nanocarrier in a drug-to-carrier ratio of 1:4. The *in-vivo* studies were conducted on twelve male Wister rats with an average weight of 230 ± 9.3 g. The rats were divided into two groups. In Group 1, the rats were orally administered pure CFZ in 0.1% w/v carboxymethylcellulose 2 mg/mL suspension. In Group 2, the rats were administered the identical dosage of the CFZ-SNMSD formula dissolved in water given orally. **Results:** The pharmacokinetics parameters in rats were obtained from plasma concentration/time data of the prepared CFZ-SNMSD formula, and these parameters were significantly higher ($p < 0.05$) when compared with CFZ-suspension. C_{max} for the CFZ-SNMSD formula was 4109 ng/mL, and T_{max} was 2 hours compared to the CFZ-suspension C_{max} value of 1401 ng/mL and 4 hours. The relative bioavailability of canagliflozin for oral SNMSD capsule to oral suspension was equal to 204.7%. This is due to soluplus® dispersibility, solubilization, and p-glycoprotein inhibitory effect, overcoming GIT membrane barriers. **Conclusions:** The utilization of SNMSD demonstrated great promise as an oral delivery system to enhance the oral bioavailability of canagliflozin.

Keywords: Self-nanomicellizing; pharmacokinetics; bioavailability; canagliflozin

RESUMEN

Evaluación de la farmacocinética *in vivo* de la dispersión sólida auto-nanomicelizante de canagliflozina en cápsulas orales

Antecedentes: La dispersión sólida auto-nanomicelizante (SNMSD) es un método que combina las ventajas de la dispersión sólida con nanomicelas, mejorando la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles en agua. Este sistema de liberación de medicamentos sólidos forma nanomicelas al entrar en

contacto con los fluidos del tracto gastrointestinal (GIT). La canagliflozina (CFZ), un inhibidor del co-transportador de sodio-glucosa, ha ganado popularidad para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Sin embargo, CFZ enfrenta desafíos biofarmacéuticos, como baja solubilidad en agua, baja permeación y susceptibilidad a la expulsión mediada por la glicoproteína P, lo cual representa un reto para su desarrollo farmacéutico. Este estudio tiene como objetivo comparar los parámetros farmacocinéticos *in vivo* de CFZ en ratas cuando se prepara como SNMSD en comparación con una suspensión de CFZ. **Métodos:** La fórmula SNMSD se preparó mediante un método de evaporación de solvente utilizando Soluplus como nanotransportador en una relación fármaco-transportador de 1:4. Los estudios *in vivo* se realizaron en doce ratas Wistar machos con un peso promedio de $230 \pm 9,3$ g. Las ratas se dividieron en dos grupos: en el Grupo 1, las ratas recibieron oralmente CFZ puro en una suspensión de 2 mg/mL en carboximetilcelulosa al 0,1% p/v. En el Grupo 2, las ratas recibieron la misma dosis de la fórmula CFZ-SNMSD disuelta en agua por vía oral. **Resultados:** Los parámetros farmacocinéticos en ratas se obtuvieron a partir de datos de concentración plasmática/tiempo de la fórmula CFZ-SNMSD, y estos parámetros fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) en comparación con la suspensión de CFZ. El valor de C_{max} para la fórmula CFZ-SNMSD fue de 4109 ng/mL, y el T_{max} fue de 2 horas en comparación con el valor de C_{max} de 1401 ng/mL y T_{max} de 4 horas de la suspensión de CFZ. La biodisponibilidad relativa de la canagliflozina para la cápsula oral de SNMSD en comparación con la suspensión oral fue del 204,7%. Esto se debe a la capacidad de dispersión, solubilización y el efecto inhibidor de la glicoproteína P de Soluplus®, superando las barreras de la membrana del GIT. **Conclusiones:** El uso de SNMSD demostró un gran potencial como sistema de liberación oral para mejorar la biodisponibilidad de la canagliflozina.

Palabras clave: Auto-nanomicelizante; farmacocinética; biodisponibilidad; canagliflozina

RESUMO

Avaliação farmacocinética *in vivo* da dispersão sólida autonanomicelizante de canagliflozina como formas de dosagem de cápsulas orais

Contexto: A dispersão sólida autonanomicelizante (SNMSD) é um método que integra as vantagens da dispersão sólida com nanomicelas, aumentando a biodisponibilidade oral de produtos farmacêuticos pouco solúveis em água. Este sistema de administração de medicamentos sólidos, quando entra em contato com fluidos do TGI, forma nanomicelas. A canagliflozina (CFZ), um inibidor do cotransportador de sódio-glicose, tornou-se popular no tratamento do diabetes tipo 2. A CFZ enfrenta desafios biofarmacêuticos, como baixa solubilidade em água, baixa permeação e suscetibilidade ao efluxo mediado pela glicoproteína P, o que representa desafios para seu desenvolvimento farmacêutico. Este estudo tem como objetivo comparar os parâmetros farmacocinéticos *in vivo* da CFZ em ratos quando preparada como SNMSD versus suspensão de CFZ. **Métodos:** A fórmula SNMSD foi preparada usando um método de evaporação de solvente usando Soluplus como nanocarreador em uma proporção de fármaco para carreador de 1:4. Os estudos *in vivo* foram conduzidos em doze ratos Wistar machos com peso médio de $230 \pm 9,3$ g. Os ratos foram divididos em dois grupos. No Grupo 1, os ratos receberam CFZ puro por via oral em suspensão de carboximetilcelulose 0,1% p/v 2 mg/mL. No Grupo 2, os ratos receberam a dosagem idêntica da fórmula CFZ-SNMSD dissolvida em água administrada por via oral. **Resultados:** Os parâmetros farmacocinéticos em ratos foram obtidos a partir de dados de concentração plasmática/tempo da fórmula CFZ-SNMSD preparada, e esses parâmetros foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados com a suspensão CFZ. C_{max} para a fórmula CFZ-SNMSD foi de 4109 ng/mL, e T_{max} foi de 2 horas em comparação com o valor C_{max} da suspensão CFZ de 1401 ng/mL e 4 horas. A biodisponibilidade relativa da canagliflozina para cápsula oral de SNMSD para suspensão oral foi igual a 204,7%. Isso se deve à dispersibilidade, solubilização e efeito inibitório da glicoproteína P do Soluplus®, superando as barreiras da membrana do TGI. **Conclusões:** A utilização de SNMSD demonstrou grande promessa como um sistema de administração oral para aumentar a biodisponibilidade oral da canagliflozina.

Palavras-chave: Autonanomicelização; farmacocinética; biodisponibilidade; canagliflozina

1. INTRODUCTION

Self-nanomicellizing solid dispersion combines widely accepted solid dispersions and nanomicelles strategies to improve the oral bioavailability of challenging drugs. This novel strategy offers the advantage of solid dispersion and nanotechnology-based approaches as it forms nanosized micelles upon contact with an aqueous media. It combines an active pharmaceutical ingredient with a single or multiple amphiphilic block copolymer. It can achieve high dissolution characteristics of poorly water-soluble compounds by its self-nanomicellizing potency [1, 2].

Canagliflozin (CFZ) is a new orally active sodium-glucose co-transporter (SGLT II) inhibitor that diminishes renal tubular glucose reabsorption and is extensively utilized for the management of type 2 diabetes mellitus (T2DM) via insulin-independent mechanisms [3].

CFZ has an absolute oral bioavailability of about 60-65%, with plasma protein binding of 99%. After a single oral dosage, CFZ terminal half-life was 10.6-13.1 hrs. It is practically insoluble in aqueous media with a significant volume of distribution of 119 L [4]

Despite its promising anti-diabetic activity, CFZ faces biopharmaceutical challenges such as poor water solubility, poor permeation, and susceptibility to P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux. These challenges can lead to erratic bioavailability, which poses a significant obstacle to developing a successful oral drug product [5].

Soluplus® is an amphiphilic copolymer utilized to improve the stability and bioavailability of hydrophobic substances. It forms a micelle with the drug through interactions between its hydrophilic and hydrophobic regions [6].

Patil *et al.* 2023 studied and evaluated *in-vitro*, *in-vivo*, and *in-silico* molecular docking canagliflozin hemihydrate-loaded bilosomes using the solvent evaporation method. The optimized formulation was tested for *in-vitro* drug release, *in-vivo* pharmacokinetic evaluation, and *in-silico* molecular docking to determine sodium deoxycholate's ability to lower blood sugar levels. The optimized CFZ-blossoms showed a 92.60% w/w EE and 177.40 nm vesicle size, significantly increasing CFZ release compared to CFZ in aqueous dispersion. CFZ-Bilosomes increased C_{max} by 1.5 times, increased bioavailability by 1.6-fold when formulated as Bilosomes, and *in-silico* molecular docking demonstrated hypoglycemic potential when combined with SDC, suggesting potential synergistic treatment for diabetes mellitus [7].

Singh *et al.* in 2021 focus on optimizing and evaluating a polymeric precipitation inhibitor-based supersaturable self-microemulsifying drug delivery system for the biopharmaceutical classification system (BCS) class IV drug CFZ. The selected formula (OSS 1), containing 781.1 mg supersaturable self-microemulsifying drug delivery system (SS SMEDDS) and 2.24% w/w Poloxamer 188, showed negligible aggregation and physical stability under various stress conditions. The formulation had an elevated solubility rate of CFZ compared to pure CFZ, and its permeability across different excised regions of the rat intestine was much greater, exhibiting a higher C_{max} and $AUC_{0-48\text{ h}}$ following oral treatment to Wistar rats. The research indicated that the considerable absorption of CFZ in SS SMEDDS was due to its affinity for P-glycoprotein substrates and considerable lymphatic absorption [8].

This study compares the *in-vivo* oral bioavailability pharmacokinetic parameters of CFZ when applied as SNMSD versus CFZ-suspension.

2. METHODS

2.1. Materials

CFZ was purchased from Wuhan Senwayer Century Chemical. Co. Ltd, China. Soluplus® from gifted BASF pharma. Dapagliflozin was gifted from Pioneer, Iraq. Ethanol 99 % (HPLC grade) was purchased from Merck, USA; Acetonitrile-HPLC grade purchased from Biosolve B V, France; and carboxymethyl cellulose and Magnesium stearate from Glentham, UK. All other reagents in this research were of analytical grade.

2.2. Preparation of self-nanomicellizing solid dispersion capsules

A solvent evaporation method was selected to prepare CFZ-SNMSD. Briefly, 100 mg of CFZ and 400 mg of soluplus were dissolved in 10 mL of ethanol using a 100 mL round-bottom flask in a bath sonicator at 25.0 ± 0.5 °C. The ethanol was evaporated at 40 °C under reduced pressure in a rotating evaporator (Buchi, turkey) revolving at 220 rpm until a thin, dry film formed on the flask's inner wall. The film was crushed and collected by spatula and screened through an 80-dimension mesh to obtain a solid system named CFZ-SNMSD and stored [9, 10]. Figure 1 shows the preparation method of CFZ-SNMSD using the solvent evaporation method.

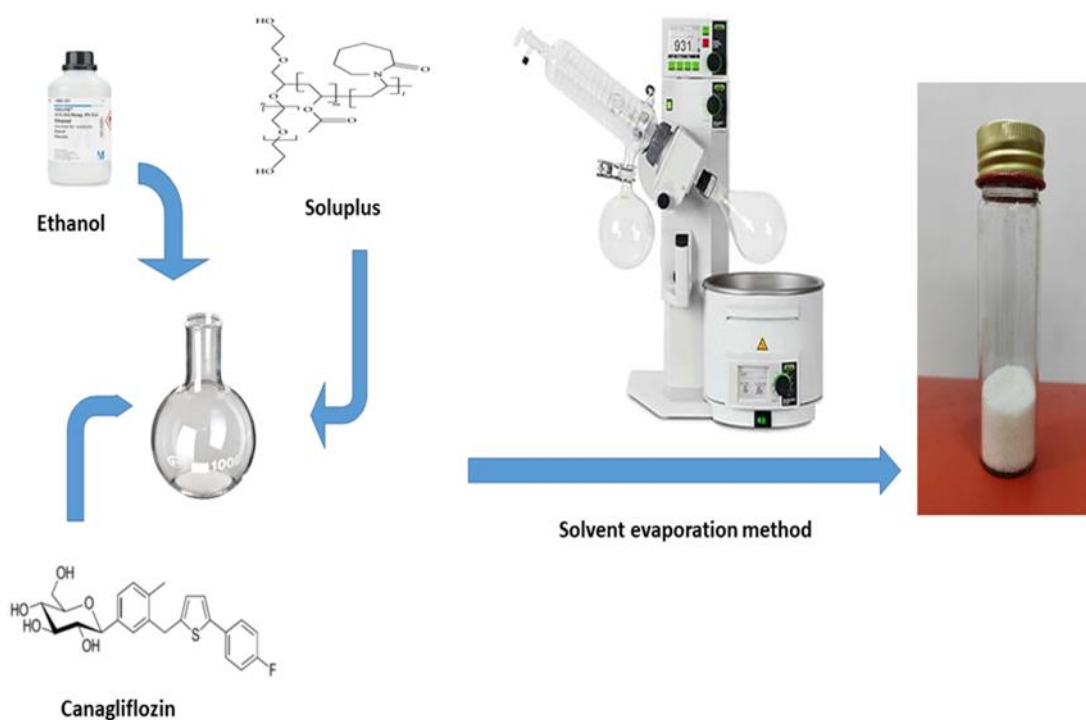


Figure 1. Solvent evaporation method of preparation of CFZ-SNMSD system

For the formulation of capsules, the capsule filler powder was prepared by mixing selected CFZ-SNMSD formula powder with an excipient. The capsules were prepared using the manual capsule-filling machine (Capsuline, Davie, FL, USA). The compositions of the CFZ - capsules are described in Table 1

Table 1. Compositions of the CFZ-Capsules Formula

Materials	Amounts
Powder equivalent to 100 mg CFZ-SNMSD	515.5 mg powder of CFZ-SNMSD
Avicel PH102	229.5 mg
Magnesium stearate	5 mg
Total weight	750 mg

2.3. Characterization of selected CFZ solid dispersion

2.3.1. Particle size and zeta potential analysis

Amounts of solid dispersion equivalent to 10 mg of CFZ were dispersed in 10 mL of deionized water and stirred at 300 rpm with a magnetic stirrer for up to one hour, filtered by a 0.45- μ m cellulose acetate syringe. The particle size (PS) and polydispersity index (PDI) of the developed CFZ-loaded nanomicelles were determined using a Malvern Panalytical Ltd Zetasizer. The electrophoretic mobility of the selected formula was assessed and converted to zeta potential. The zeta potential value indicates the charge on the nanomicelles [11].

2.4. *In-vivo* pharmacokinetic study

2.4.1. Animals

The *in-vivo* studies were conducted on male Wister rats (n=12) with an average weight of approximately 230 $\pm$ 9.3 g. Upon procurement, the rats could acclimate for at least one week under standard room temperature conditions (25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C). This acclimatization period guarantees that the rats adjust to their new surroundings before the commencement of the study.

2.4.2. Dose calculation

The dose of CFZ for rats was estimated based on the body weight of the rats and the surface area ratio. The animal dose can be calculated using equation 1 [12].

$$\text{Animal dose } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{human dose } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times \text{conversion factor} \quad \dots\dots \text{Eq. (1)}$$

The correction factor for rats weighing 0.080 - 0.250 kg is 6.17

When a typical rat weighs 230 g, the human weight is 70 kg, and the average human oral dose of CFZ is 100 mg, converted to mg /kg by dividing it by human weight (70 kg), equal to 1.4285 mg/kg.

The oral dose of rats = 1.428 $\times$ 6.17

Oral dose of rats = 8.81 mg /kg

The oral dose for each rat = 2 mg

2.4.3. Study design

The rats were partitioned into two groups, each including six rats. In Group 1, the rats were orally administered 8.8 mg/kg of pure CFZ in 0.1% w/v carboxymethylcellulose (CMC) suspension to give 2 mg/mL. In Group 2, the rats were administered the same dose of the CFZ-capsule dissolved in water to obtain 2 mg/mL, also given orally. Before the administration, the rats were fasted overnight but had free access to water throughout the study. The formulation was administered to the rats using a gavage tube. This method of administration ensures precise dosing of the drugs to the rats. Blood samples were obtained from the retro-orbital venous

plexus before dosage administration to acquire a baseline measurement (time point zero) and after administration at different time intervals at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, and 48 hrs, in EDTA vacuum glass tubes. The plasma was separated by centrifugation in the centrifuge (Hettich, Germany) at 6000 rpm for 10 min and kept at -25 °C until analysis [13].

2.4.4. HPLC determination of canagliflozin

The Shimadzu HPLC system was used for this study. HPLC system with a UV detector, micro-volume double plunger pump along 4.6 *150mm C-18 analytical column maintained at room temperature. HPLC analysis was performed under the following conditions: The mobile phase consists of HPLC grade of acetonitrile: 0.1% w/v orthophosphoric acid at a ratio of 50:50 % v/v at ambient temperature. The mobile phase was filtered by a 0.45 µm filter before use, and the injection volume was 20 µL. The mobile phase was kept at a 1.0 mL/min flow rate. The UV detector was employed to detect the substance at a wavelength of 290 nm, and the running time was 10 minutes. The column was equilibrated for a minimum of 25 minutes before the injection of the drug solution, with the mobile phase flowing through the system. The method was validated using canagliflozin by ICH and FDA criteria regarding specificity/selectivity, linearity, LOD, LOQ, accuracy, and precision [14].

2.4.5. Sample preparation

A simple liquid-liquid extraction technique was used to extract analyte and IS from plasma. The plasma samples (stored at -20 °C) were allowed to be thawed before sample preparation. An aliquot of 200 µL of plasma sample and 20 µL of IS solution (10 µg/mL of dapagliflozin) was added into the tube and vortex-mixed for 30 seconds, followed by the addition of 2 mL of acetone into each tube. The vortex mixing was conducted for 1 minute, subsequently followed by centrifugation at 5000 rpm for 4 minutes. After centrifugation, the organic portion was transferred to an acrylic tube, evaporated to dryness, and reconstituted with 200 µL of mobile phase; from this, 20 µL was injected into the HPLC for analysis. The unknown concentration of CFZ was calculated using the equation obtained from the spiked calibration curve [15].

2.4.6. Pharmacokinetic evaluation

Pharmacokinetic (PK) parameters were evaluated using conventional noncompartmental methods with the aid of PK solver software. The plasma concentration-time data determined essential pharmacokinetic parameters, including C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, and AUC_{0-48} of CFZ [16]. Relative bioavailability (F) is calculated by equation 2: [17].

$$F \text{ relative} = \frac{AUC \text{ standard} * \text{dose test}}{AUC \text{ test} * \text{dose standard}} \times 100 \quad \dots\dots\dots Q(2)$$

2.4.7. Statistical analysis

The study employed one-way ANOVA to analyze results parameters, identifying statistically significant differences between groups at p values of $P < 0.05$ and non-significant at $P > 0.05$ using Microsoft Excel 2016. The experimental results were presented as the mean samples $\pm$ Sd. The PK parameters, such as C_{max} , T_{max} , and AUC_{0-48} , underwent statistical examination by a Student's t-test [18].

3. RESULTS

3.1. Particle size and zeta potential analysis

In the selected CFZ- solid dispersion formula at a ratio of CFZ: Soluplus® 1:4, which gives PS of 61.79±1.06 nm with PDI of 0.058±0.002, indicating good formulation stability upon dilution in GIT. Figure 2 shows the average particle size for the selected CFZ- SNMSD formula. Zeta potential determined for selected CFZ-solid dispersion. The result indicates a value of -9.4 mV ±0.2 of the Zeta potential d for selected CFZ- SNMSD as shown in Figure 2 which revealed the intensity and position of the zeta peak for the selected formula.

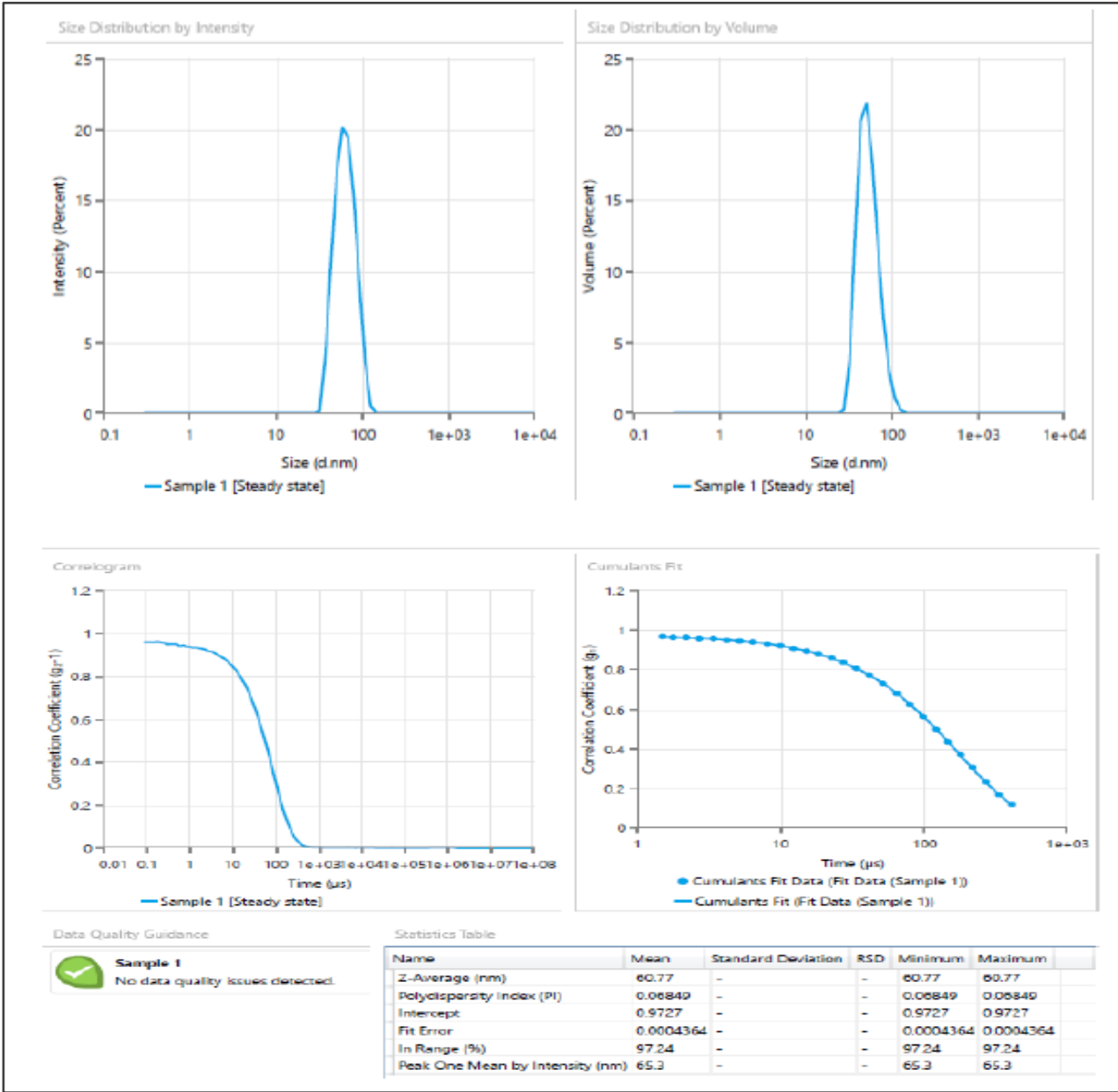


Figure 2. Average particle size for selected CFZ- SNMSD formula by Malvern zeta seizer represents the intensity of particle size and the cumulative data

3.2. Preparation of CFZ-SNMSD capsules

Hard gelatin capsules of 000 size were used in filling CFZ-capsule since they are the most suitable size for the contents of dose encapsulation, according to calculation, depending on the tapped density of the blending power for capsules obtained.

3.3. Validation of the HPLC method

The plasma sample demonstrated symmetric peaks with retention times of about 4.79 min for CFZ and 2.92 min for dapagliflozin (IS), as illustrated in Figures 3A and B, respectively. In contrast, Figure 3C is HPLC Chromatograms of CFZ in plasma spiked with IS (dapagliflozin).

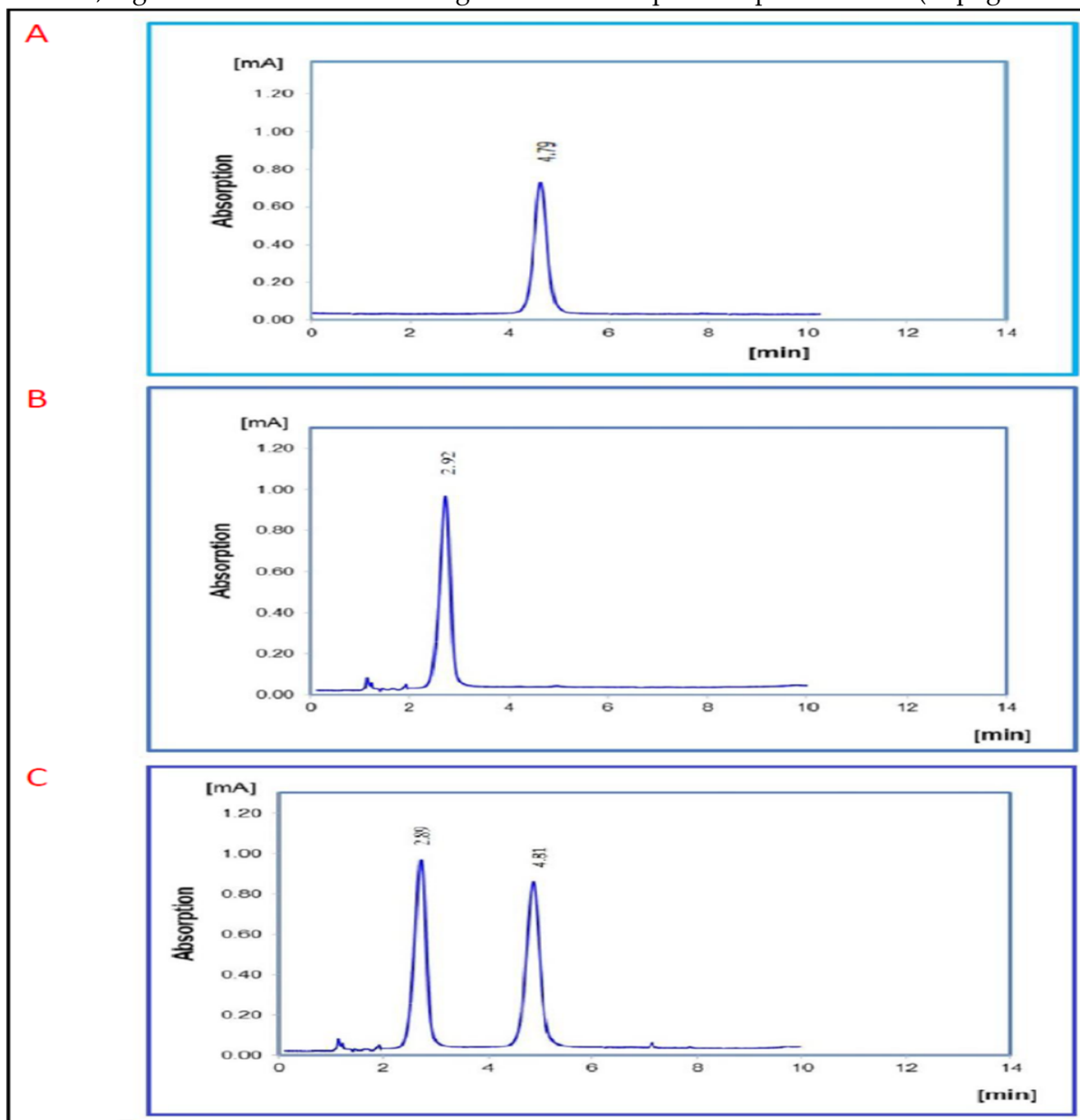


Figure 3. HPLC Chromatograms HPLC of A- canagliflozin in the mobile phase B- plasma spiked with IS (dapagliflozin) C- canagliflozin in plasma spiked with IS (dapagliflozin)

Figure 4 displays the calibration curves of CFZ by the HPLC method, obtained by plotting the ratio of the peak area of the canagliflozin to the area of IS (dapagliflozin) against CFZ concentration. These curves exhibit a straight line and a high correlation coefficient of 0.9999; the regression equation was ($Y = 0.1046X + 0.0072$).

LOD of canagliflozin = $3.3 \times 0.002625 / 0.1046 = 0.0828 \mu\text{g/mL}$

LOQ of canagliflozin = $10 \times 0.002625 / 0.1046 = 0.25 \mu\text{g/mL}$

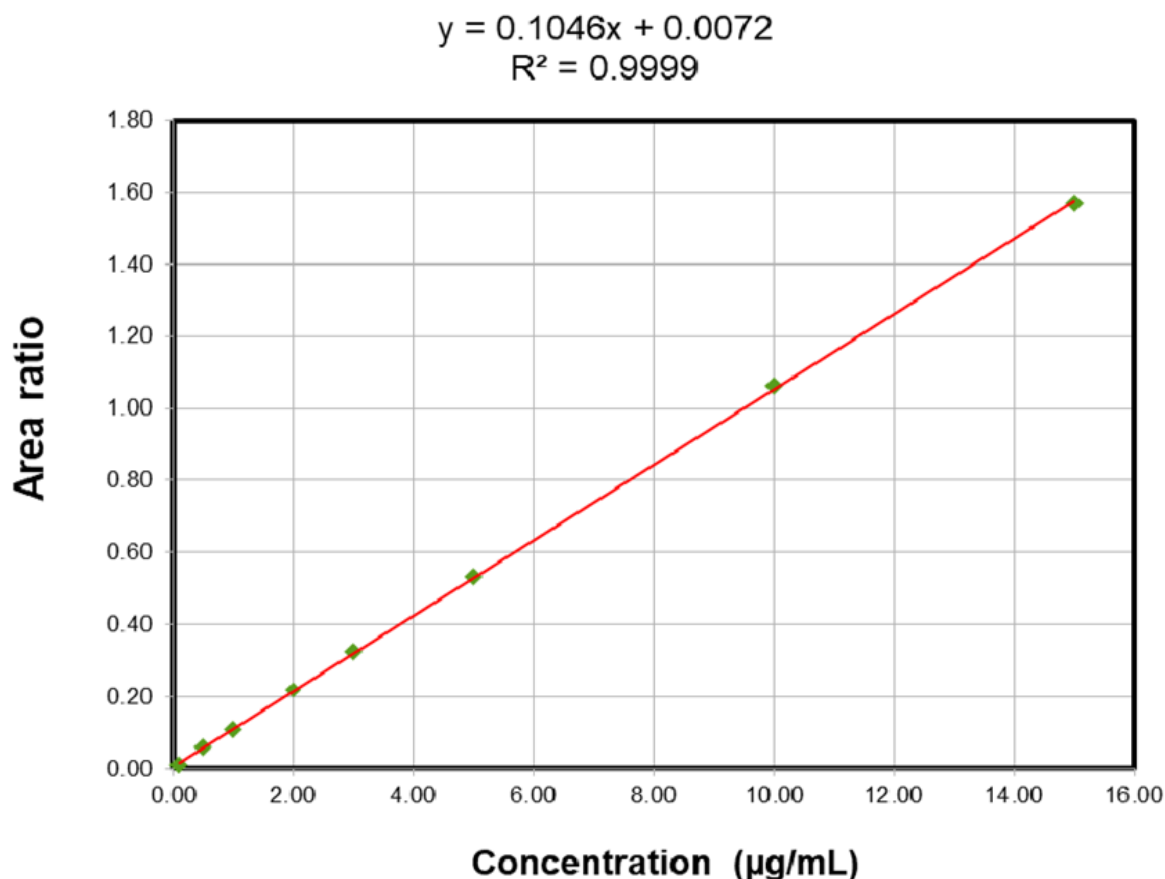


Figure 4. Calibration curve of spiked plasma with canagliflozin and dapagliflozin as internal standard

3.4. Determination of pharmacokinetic parameters

The *in-vivo* pharmacokinetics parameters of the selected CFZ-SNMSD formula were conducted after oral administration in rats and compared with the oral suspension of the pure drug. Figure 5 shows oral CFZ suspension's mean plasma concentration-time profiles versus the CFZ –SNMSD oral capsule formula. The pharmacokinetic parameters of the oral CFZ-suspension and selected CFZ-SNMSD formula were also presented in Table 2.

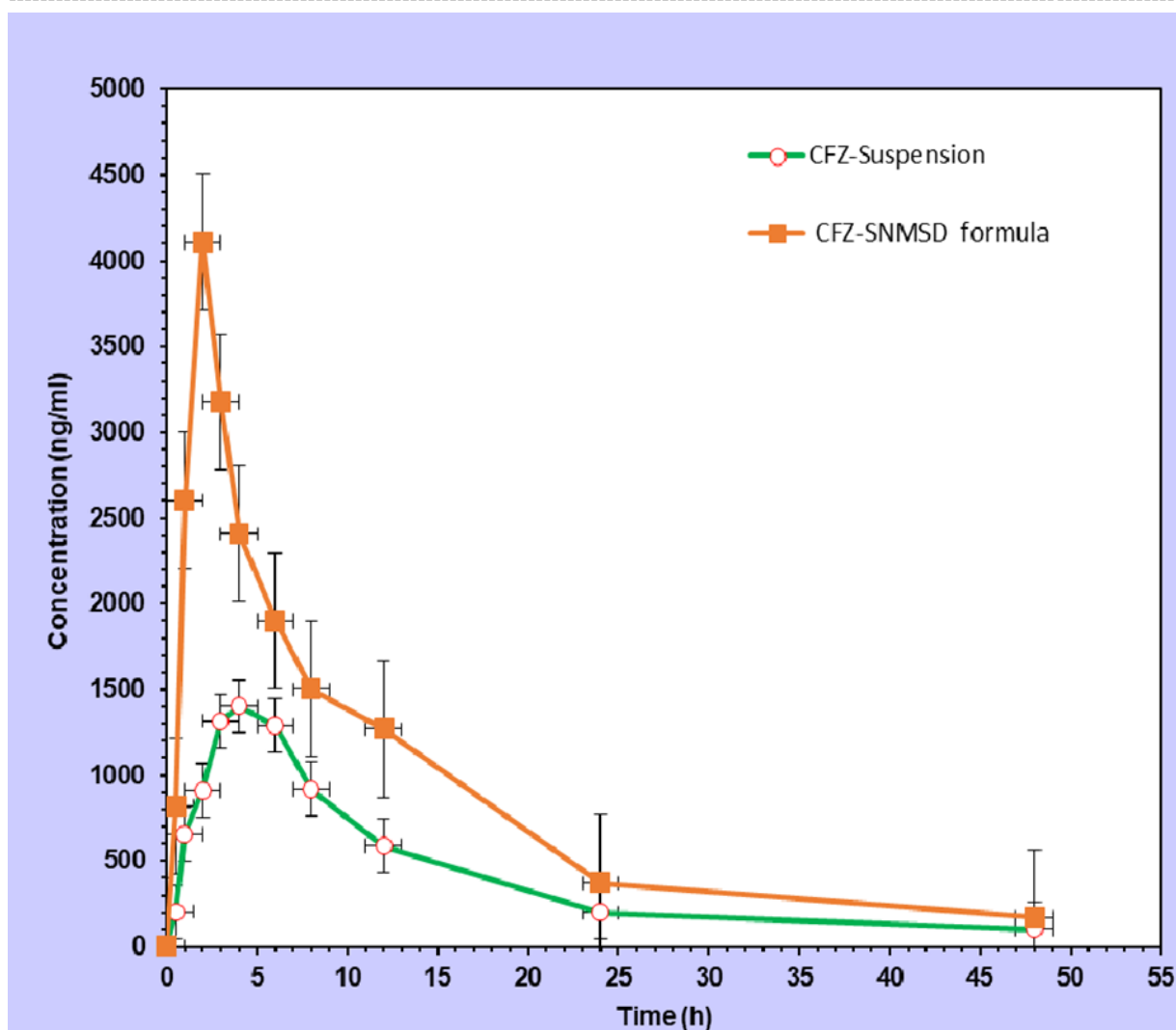


Figure 5. Plasma concentration of CFZ-SNMSD capsules versus CFZ-suspension

Table 2: Pharmacokinetics Parameters of CFZ-SNMSD Formula versus CFZ-Suspension in rats

Parameter	Unit	CFZ suspension	CFZ - SNMSD
C_{max}	ng/mL	1401	4109
T_{max}	hr	4	2
AUC 0-48	ng/mL×hr	19758.75	40440.75
Estimated $t_{1/2}$	hr	11.28	11.44

4. DISCUSSION

In the selected CFZ- solid dispersion formula at a ratio of CFZ: Soluplus® 1:4, the results show better results in terms of PS and PDI due to the low CMC of Soluplus®. The CMC is an essential parameter influencing the stability of the nanomicelles *in vitro* and *in vivo*. Soluplus® is a hydrophilic graft copolymer that can quickly form colloidal micelles with excellent solubilization ability and stability due to its low value of CMC (0.0076 mg/mL). The low CMC value ensures the CFZ self-nanomicellizing formula has high stability upon extreme dilution in GIT [19].

Optimized CFZ-SNMSD containing soluplus® formulation showed a slightly negative surface charge; since pure Soluplus® micelles themselves reported have a slightly negative surface charge, the absence of charge in this parameter upon loading CFZ would imply their complete allocation within the core of the nanomicelles and not on their surface [20].

Good micrometric properties of the particles are obtained for the CFZ- capsules blend powder, which may be due to the physical properties of the diluent. Avicel®PH102 is micro-crystalline cellulose that possesses good flow properties [21].

The specificity of the HPLC method was verified by examining the chromatogram of blank rat plasma spiked with the CFZ, plasma spiked with the internal standard (IS) (dapagliflozin), and plasma spiked with CFZ and IS (dapagliflozin). No interference was observed at the retention time of the canagliflozin peak, confirming the method's specificity for accurately quantifying CFZ in the presence of other components in the plasma samples. Dapagliflozin was chosen as an internal standard due to its chemical structure similar to that of CFZ, its consistent behavioral characteristics, and its physical and chemical properties, which align with the chemical requirement for HPLC. Its commercial availability and high purity ensure stability and avoid reactions with samples or mobile phases. While studying linear regression analysis shows a linear relationship between peak areas and concentrations of CFZ in the range of 0.1-15 µg/mL. The respective linear equation gives a high correlation coefficient (0.9999). The study determined the LOD of CFZ was 0.0828 µg/mL, and the LOQ of CFZ was 0.25 µg/mL. The LOD and LOQ represent the lowest concentrations that yield a signal-to-noise ratio of at least 3:1 and 10:1, respectively.

The C_{max} of CFZ is (1401± 5.7 ng/mL), and (4109±0.11 ng/mL) in oral suspension and oral SNMSD capsule formula, respectively. The low C_{max} of CFZ suspension indicates poor delivery of the pure drug from the oral route, while the C_{max} of CFZ-SNMSD was much higher. In other words, the C_{max} of CFZ- SNMSD capsule was significantly ($p < 0.05$) superior over oral CFZ suspension. In addition, the T_{max} value of CFZ- SNMSD was significantly less than that of oral CFZ suspension; this may be attributed to the higher and rapid absorption of the SNMSD. Furthermore, AUC_{0-48} value of CFZ- SNMSD oral capsules was estimated to be (40440.75±21.2 ng/ml*h) which was significant ($p < 0.05$) compared to AUC_{0-48} values of CFZ suspension (19758.75 ±12.3 ng /ml*h). The relative bioavailability (F) of canagliflozin (AUC_{0-48} oral SNMSD capsule / AUC_{0-48} oral suspension) was equal to 204.7%. A high C_{max} and a low T_{max} in the CFZ-SNMSD capsule indicated an enhancement in the bioavailability of the CFZ [22].

The results obtained in our study are higher in terms of pharmacokinetic parameters than that obtained by Patil *et al.* (2023) who conducted a study on CFZ-loaded bilosomes, prepared by solvent-evaporation method in which the optimized formula showed a 1.5-fold increase in C_{max} and 1.6-fold increase in relative bioavailability when formulated as bilosomes compare to the pure drug [7].

The reasons for increased CFZ bioavailability in the SNMSD formula compared to pure drugs in suspension are due to solubility enhancement by the presence of soluplus, which increased the solubility of CFZ in water. The permeability and solubility of CFZ are enhanced by soluplus due to nanomicelles formation, leading to increased drug absorption. Also, soluplus inhibits CFZ precipitation and crystallization, keeping drug supersaturation in the GIT. Additionally, it improves drug wettability and stability, which is vital for improving drug dissolution and absorption [23, 24].

The study found that nanomicelle formulation significantly enhances intestinal permeation by presenting CFZ in a solubilized form at its absorption sites, compared to the crystalline

state of a pure CFZ. The nanomicelles provide a large surface area for penetration, and nanosized particles can internalize cells through the endocytosis pathway [25].

Soluplus® is commonly studied for its solubilizing properties and ability to improve the bioavailability of drugs with poor aqueous solubility. There have been several studies that explore the use of Soluplus® as a nanocarrier to enhance the bioavailability of poorly soluble drugs, including canagliflozin, and that investigate its potential effect on P-glycoprotein (P-gp) inhibition. One study that supports the claim of solubilization and P-gp inhibition by Rehman *et al.* (2017) examined the role of Soluplus® in the inhibition of P-gp activity. They found that Soluplus® reduced the efflux of certain drugs mediated by P-gp, which could potentially increase drug (Darunavir) absorption and bioavailability. This was assessed by transport studies across Caco-2 cell monolayers, which are commonly used as a model for intestinal absorption [26].

Another study by Jassem & Abd (2024) explored the development of nanodispersion formulations of canagliflozin, using surfactants like poloxamers and Soluplus®. They found that formulations with Soluplus® had a significantly enhanced dissolution rate and bioavailability compared to the free drug [27].

5. CONCLUSIONS

The study concludes that the subsequent in-vivo pharmacokinetic study (C_{max} , T_{max} , and AUC₀₋₄₈) indicated valuable improvement in the oral bioavailability parameters of CFZ-SNMSD oral capsules in rats as compared with pure CFZ in 0.1% w/v carboxymethylcellulose suspension. This study was a suitable strategy for enhancing canagliflozin's dissolution and oral bioavailability.

DECLARATION

Ethical approval: All experimental methods were reviewed and authorized by the Institutional Animal Ethical Committee at the College of Pharmacy, University of Baghdad (Approval No: RECAUBCP1420245).

Conflict of Interest: The authors report no conflict of interest.

Funding: This research received no external funding.

Author contributions: the author contributed to the development, analysis, writing, and review of this article.

REFERENCES

1. S. Onoue, H. Suzuki, Y. Kojo, S. Matsunaga, H. Sato, T. Mizumoto, *et al.* Self-micellizing solid dispersion of cyclosporine A with improved dissolution and oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**, 16–22 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.05.006>
2. H. Suzuki, Y. Kojo, K. Yakushiji, K. Yuminoki, N. Hashimoto & S. Onoue. Strategic application of self-micellizing solid dispersion technology to respirable powder formulation of tranilast for improved therapeutic potential. *International Journal of Pharmaceutics*, **499**(1–2), 255–262 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.065>
3. D. Singh, A.K. Tiwary & N. Bedi. Canagliflozin loaded SMEDDS: formulation optimization for improved solubility, permeability, and pharmacokinetic performance. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **49**, 67–85 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0385-5>

4. R. Lajara. The potential role of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in combination therapy for type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **15**(17), 2565–2585 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.968551>
5. D. Singh, A.P. Singh, D. Singh, A.K. Kesavan, S. Arora, A.K. Tiwary, *et al.* Enhanced oral bioavailability and anti-diabetic activity of canagliflozin through a spray dried lipid-based oral delivery: a novel paradigm. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28**(1), 191–208 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00330-3>
6. J.Y. Lee, W.S. Kang, J. Piao, I.S. Yoon, D.D. Kim & H.J. Cho. Soluplus®/TPGS-based solid dispersions prepared by hot-melt extrusion equipped with twin-screw systems for enhancing oral bioavailability of valsartan. *Drug Design, Development and Therapy*, **9**, 2745–2756 (2015). Doi: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84070>
7. S. Patil, S. Bahadure & S. Patil. Formulation of canagliflozin hemihydrate-loaded bilosomes for the treatment of Type-2 diabetes mellitus: *in vitro*, *in vivo* and *in silico* molecular docking studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **86**, 104630 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104630>
8. D. Singh, A.K. Tiwary, T.S. Kang & N. Bedi. Polymeric precipitation inhibitor based supersaturable self-microemulsifying drug delivery system of canagliflozin: Optimization and evaluation. *Current Drug Delivery*, **18**(9), 1352–1367 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2174/1567201818666210217155909>
9. H. Wang, Y. He, Y. Hou, Y. Geng & X. Wu. Novel self-nanomicellizing formulation based on Rebaudioside A: A potential nanoplatform for oral delivery of naringenin. *Materials Science and Engineering: C*, **112**, 110926 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110926>
10. N.A. Jassem & S.N.A. Alhammid. *Ex vivo* permeability study and *in vitro* solubility characterization of oral canagliflozin self-nanomicellizing solid dispersion using Soluplus® as a nanocarrier. *Acta Marisiensis - Seria Medica*, **70**(2), 42–49 (2024). Doi: <https://doi.org/10.2478/amma-2024-0011>
11. U. Varia, V. Soni, H. Katariya, K. Detholia, M. Jadeja & D. Joshi. *Development and evaluation of rizatriptan benzoate-loaded nanostructured lipid carriers for the treatment of migraine*. Research Square Preprints, 2022; 23 p. Doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1893437/v1>
12. S. Jacob, A.B. Nair & M.A. Morsy. Dose conversion between animals and humans: A practical solution. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, **56**(3), 600–607 (2022). URL: <https://archives.ijper.org/sites/default/files/IndJPhaEdRes-56-3-600.pdf>
13. O.S. Salih & E.J. Al-Akkam. Pharmacokinetic parameters of ondansetron in rats after oral solution and transdermal invasomes gel: A comparison study. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, **13**(1), 116–121 (2023). Doi: <https://doi.org/10.51847/hs5a27ei6o>
14. K.R. Gupta, S. Shelke, A.V. Ganorkar, N. Patel & M.J. Umekar. Analysis of canagliflozin in rat plasma after oral administration by liquid chromatographic as (pharmacokinetic study). *Asian Journal of Applied Chemistry Research*, **9**(2), 22–30 (2021). Doi: <https://doi.org/10.9734/ajacr/2021/v9i230210>
15. H. Li, T. Bigwarfe, M. Myzithras, E. Waltz & J. Ahlberg. Application of Mitra® microsampling for pharmacokinetic bioanalysis of monoclonal antibodies in rats. *Bioanalysis*, **11**(1), 13–20 (2019). Doi: <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0228>
16. S. Satyavert, S. Gupta, A.B. Nair & M. Attimarad. Development and validation of a bioanalytical method for the determination of hydrazinocurcumin in rat plasma and organs by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*, **1156**, 122310 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122310>
17. B. Davit, D. Conner & L. Shargel. Drug product performance, *in vivo*: Bioavailability and bioequivalence. In: L. Shargel & A.B.C. Yu (editors). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 7th ed. McGraw-Hill, Inc., New York (NY), 2016; chapter 16, pp. 469–528. URL: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1592§ionid=100673388>
18. S.H. Jaber & N.A. Rajab. Preparation, *in vitro*, *ex vivo*, and pharmacokinetic study of lasmiditan as intranasal nanoemulsion-based *in situ* gel. *Pharmaceutical Nanotechnology*, **13**(1), 239–253 (2024). Doi: <https://doi.org/10.2174/0122117385285009231222072303>
19. M.C. Bergonzi, M. Vasarri, G. Marroncini, E. Barletta & D. Degl’Innocenti. Thymoquinone-loaded Soluplus®-Solutol® HS15 mixed micelles: Preparation, *in vitro* characterization, and effect on the

- SH-SY5Y cell migration. *Molecules*, **25**(20), 4707 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25204707>
20. F. Alvarez-Rivera, D. Fernández-Villanueva, A. Concheiro & C. Alvarez-Lorenzo. A-Lipoic acid in Soluplus® polymeric nanomicelles for ocular treatment of diabetes-associated corneal diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105**(9), 2855–2863 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.006>
 21. D.A. Gaber, M.A. Alnwiser, N.L. Alotaibi, R.A. Almutairi, S.S. Alsaeed, S.A. Abdoun, *et al.* Design and optimization of ganciclovir solid dispersion for improving its bioavailability. *Drug Delivery*, **29**(1), 1836–1847 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2083723>
 22. W. Xu, P. Ling & T. Zhang. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Drug Delivery*, **2013**, 340315 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/340315>
 23. R.N. Shamma & M. Basha. Soluplus®: A novel polymeric solubilizer for optimization of carvedilol solid dispersions: formulation design and effect of method of preparation. *Powder Technology*, **237**, 406–414 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.12.038>
 24. V. Nekkanti, Z. Wang & G.V. Betageri. Pharmacokinetic evaluation of improved oral bioavailability of valsartan: Proliposomes versus self-nanoemulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech*, **17**(4), 851–862 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0388-8>
 25. M. Linn, E.M. Collnot, D. Djuric, K. Hempel, E. Fabian, K. Kolter, *et al.* Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45**(3), 336–343 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.11.025>
 26. S. Rehman, B. Nabi, M. Fazil, S. Khan, N.K. Bari, R. Singh, S. Ahmad, V. Kumar, S. Baboota & J. Ali. Role of P-glycoprotein inhibitors in the bioavailability enhancement of solid dispersion of Darunavir. *BioMed. Res. Int.*, **2017**, 8274927 (2017). Doi: <http://doi.org/10.1155/2017/8274927>
 27. NA. Jassem & S.N. Abd Alhammid. Enhancement of the dissolution and solubility of canagliflozin using nanodispersion systems. *Al-Rafidain J. Med. Sci.*, **6**(1), 222–231 (2024). Available from: Doi : <http://doi.org/10.54133/ajms.v6i1.639>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

N.A. Jassem. *In-vivo* pharmacokinetics evaluation of canagliflozin self-nanomicellizing solid dispersion as oral capsules dosage forms. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 272–285 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.117438>

Diseño de una crema fitocosmética a partir del extracto de cáscara de *Nephelium lappaceum* L. aplicando un diseño de mezcla

Gerson Jeriel Palacios Velepucha^{1a}, Karelys Elibeth Vargas González^{1b}, Viviana García Mir^{1c}, Laura Leonor Valdez López^{2d} & Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén^{3e}

¹ Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil, Ecuador

³ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba

Correos electrónicos:

^a galacios2@utmachala.edu.ec

^b kvargas2@utmachala.edu.ec

^c vgarcia@utmachala.edu.ec

^d laura.valdezl@ug.edu.ec

^e yamiletgg@ifal.uh.cu

Recibido: 23 de septiembre de 2024

Corregido: 6 de febrero de 2025

Aceptado: 13 de febrero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116703>

RESUMEN

Objetivo: Diseñar una crema a partir de un extracto hidroalcohólico de la cáscara de *Nephelium lappaceum* L (achotillo) para fines cosméticos. **Métodos:** Se evaluó la calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico al 80 % de cáscaras de achotillo, determinando su actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH. En el diseño de la crema se utilizó un diseño de mezcla con restricciones, con cera auto-emulsionable, alcohol cetílico y agua como factores, y pH y extensibilidad (24 y 72 horas) como variables respuesta. Se realizó una evaluación sensorial de las formulaciones óptimas (100 % deseabilidad) mediante encuestas a 50 estudiantes universitarios. El Análisis de Correspondencia Múltiple se utilizó para explorar relaciones entre variables significativas. Preliminarmente, se evaluó la estabilidad de la formulación 13 bajo condiciones de estrés térmico y centrifugación. El análisis microbiológico siguió la norma INEN 2867:2015 para productos cosméticos. **Resultados:** La droga cruda y el extracto presentaron valores comparables a estudios previos, y la actividad antioxidante por DPPH fue de 9,0603 mg/g TEAC. Los datos de extensibilidad se ajustaron a modelos cuadráticos significativos ($p < 0,05$) con un R^2 de 0,7829. La evaluación sensorial identificó a la formulación 13 como la más aceptada, la cual mostró un pH 5,10, viscosidad y extensibilidad adecuadas. Las pruebas de estabilidad física preliminares arrojaron resultados favorables y las formulaciones no mostraron crecimiento bacteriano o fúngico. **Conclusiones:** Se diseñó un nuevo producto fitocosmético con extracto de *Nephelium lappaceum* L., utilizando diseño experimental para optimizar componentes. La formulación 13 destacó por su alta aceptación sensorial.

Palabras clave: *Nephelium lappaceum* L (achotillo); crema fitocosmética; diseño D-optimal; evaluación sensorial.

SUMMARY

Design of a phytocosmetic cream from *Nephelium lappaceum* L. peel extract applying a mixture design

Objective: To design a cream using a hydroalcoholic extract from the peel of *Nephelium lappaceum* L (rambutan) for cosmetic purposes. **Methods:** The quality of the raw material and the 80% hydroalcoholic extract of rambutan peel was evaluated, and antioxidant activity was determined using the DPPH assay. A constrained mixture design was employed for the cream formulation, with self-emulsifying wax, cetyl alcohol, and water as factors, and pH and spreadability (measured at 24 and 72 hours) as response variables. Sensory evaluation of the optimal formulations (100% desirability) was conducted via surveys with 50 university students. Multiple Correspondence Analysis was applied to explore relationships between significant variables. Preliminary stability of formulation 13 was assessed under thermal stress and centrifugation conditions. Microbiological analysis was performed in accordance with the INEN 2867:2015 standard for cosmetic products. **Results:** The raw material and extract demonstrated values consistent with previous studies, with antioxidant activity measured at 9.0603 mg/g TEAC by DPPH. Spreadability data fit significant quadratic models ($p < 0.05$) with an R^2 of 0.7829. Sensory evaluation identified formulation 13 as the most preferred, exhibiting a pH of 5.10, and appropriate viscosity and spreadability. Preliminary physical stability tests yielded favorable results, with no bacterial or fungal growth detected in the formulations. **Conclusions:** A novel phytocosmetic cream incorporating *Nephelium lappaceum* L. extract was successfully developed using experimental design techniques to optimize component ratios. Formulation 13 stood out for its high sensory acceptance.

Keywords: *Nephelium lappaceum* L (achotillo); phytocosmetic cream; D-optimal design; sensory evaluation.

RESUMO

Desenvolvimento de um creme fitocosmético a partir do extrato da casca de *Nephelium lappaceum* L. aplicando um design de mistura.

Objetivo: Desenvolver um creme a partir de um extrato hidroalcoólico da casca de *Nephelium lappaceum* L. (achotillo) para fins cosméticos. **Métodos:** Avaliou-se a qualidade da droga crua e do extrato hidroalcoólico a 80% das cascas de achotillo, determinando sua atividade antioxidante por DPPH. No desenvolvimento do creme, utilizou-se um design de mistura com restrições, com cera autoemulsionante, álcool cetosteárilico e água como fatores, e pH e extensibilidade (24 e 72 horas) como variáveis resposta. A avaliação sensorial das formulações ótimas (100% de desejabilidade) foi realizada por meio de questionários aplicados a 50 estudantes universitários. A Análise de Correspondência Múltipla foi utilizada para explorar relações entre variáveis significativas. Preliminarmente, avaliou-se a estabilidade da formulação 13 em condições de estresse térmico e centrifugação. A análise microbiológica seguiu a norma INEN 2867:2015 para produtos cosméticos. **Resultados:** A droga crua e o extrato apresentaram valores comparáveis a estudos anteriores, e a atividade antioxidante por DPPH foi de 9,0603 mg/g TEAC. Os dados de extensibilidade ajustaram-se a modelos quadráticos significativos ($p < 0,05$) com um R^2 de 0,7829. A avaliação sensorial identificou a formulação 13 como a mais aceita, com pH de 5,10, viscosidade e extensibilidade adequadas. Os testes preliminares de estabilidade física apresentaram resultados favoráveis e as formulações não mostraram crescimento bacteriano ou fúngico. **Conclusões:** Foi desenvolvido um novo produto fitocosmético com extrato de *Nephelium lappaceum* L., utilizando design experimental para otimizar os componentes. A formulação 13 destacou-se por sua alta aceitação sensorial.

Palavras-chave: *Nephelium lappaceum* L. (achotillo); creme fitocosmético; design D-Optimal; avaliação sensorial.

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la cosmética, la búsqueda de ingredientes naturales y sostenibles ha cobrado un interés creciente debido a la preferencia de los consumidores por productos más seguros y ambientalmente responsables. A pesar de este interés, el desarrollo de formulaciones cosméticas utilizando componentes naturales presenta desafíos significativos. En este contexto, el uso de subproductos agroindustriales como las cáscaras de frutas ofrece una doble ventaja: la valorización de desechos y la incorporación de ingredientes bioactivos con potenciales beneficios para la piel [1, 2].

Nephelium lappaceum L., conocido comúnmente como rambután o achotillo en Ecuador, es un fruto de la familia Sapindaceae, originario del sudeste asiático. Este fruto, de forma ovalada, se distingue por su cáscara cubierta de pelos y sus colores llamativos, que varían entre rojo, amarillo y naranja, haciéndolo fácilmente reconocible por su apariencia exótica y atractiva [3]. Su pulpa, de sabor refrescante, se consume fresca, enlatada o procesada, mientras que los residuos, como las semillas y cáscaras, son generalmente desechados a gran escala. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que la cáscara del achotillo, que normalmente se considera un desecho, contiene metabolitos de gran interés como ácido elágico, corilagina, geraniina, β -caroteno y vitamina C, los cuales poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiobesogénicas y antidiabéticas [4]. Estos compuestos son capaces de neutralizar los radicales libres, protegiendo así la piel contra el daño oxidativo debido a su elevada actividad antioxidante. Además, la presencia de compuestos fenólicos y cumarinas en la cáscara la convierte en un ingrediente valioso para aplicaciones en las industrias nutracéutica, farmacéutica, fitocosmética y alimentaria [5].

Considerando el impacto en la salud pública y la posibilidad de aprovechar los desechos del procesamiento de frutas, el objetivo de este trabajo es diseñar una crema a partir de un extracto hidroalcohólico de la cáscara de *Nephelium lappaceum* L (achotillo) para fines cosméticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección, selección y procesamiento del material vegetal

Los frutos de achotillo de la variedad amarga/ácida fueron recolectados en marzo de 2023 en la hacienda “Voluntad de Dios” vía a cañalito km 7,5 en la Ciudad de Quevedo – Los Ríos – Ecuador (1°1'49" S y 79°24'48" E). Se seleccionaron plantas adultas en estado de floración-fructificación, de aproximadamente 15 a 25 m de altura. El código de identificación asignado fue GUAY-13.114 (Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil).

A los frutos se le realizó un análisis macromorfológico y morfométrico considerando: morfología, tamaño, olor, color y textura de los órganos vegetales [6]. Se seleccionaron 100 frutos frescos al azar y se midió la longitud y el ancho de la cáscara del achotillo utilizando un calibre Vernier INCCO.

Los exocarpios (cáscara) de achotillo en buen estado se pelaron, se lavaron con agua potable para eliminar la pulpa y luego con agua destilada. Posteriormente, las cáscaras se secaron en una estufa de recirculación de aire (Memmert Basic UNB 400) a una temperatura de 50 °C hasta alcanzar peso constante. Las muestras se trituraron en un molino de cuchilla Pulvex hasta alcanzar un tamaño de partícula de 2 mm. Finalmente, se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente.

2.2. Control de calidad de la droga cruda

Todos los ensayos se efectuaron por triplicado siguiendo la metodología establecida por la USP 43-NF 38 [7] y OMS [8]

En el análisis granulométrico se utilizaron 50 g de droga cruda, los cuales, se colocaron en la parte superior del equipo tamizador de la marca WS-Tyler Mentor OH Model RX-99. La batería de tamices utilizada fue: 0,125; 0,150; 0,250; 0,425 y 1,18 mm, con una frecuencia de vibración 7 Hz, durante 5 minutos [9]. Luego se pesó el contenido de sólidos retenido en cada tamiz en la balanza analítica Pioneer Ohaus.

La humedad se determinó en la balanza termogravimétrica OHAUS de la serie MB 90/120, donde se pesó 2 g de droga cruda (desviación de 0,5 mg) y se ajustó la temperatura a 105 °C y el tiempo de secado 5 minutos.

Las cenizas totales se evaluaron en una mufla modelo Navertherm L-150KICN. Las pesadas se realizaron en balanza analítica marca Radwag (serie AS 310.R2).

En la determinación de sustancias solubles se siguió la metodología descrita por Miranda y Cuellar (2000) y Valdez-López *et al.* (2022) [10]. El experimento se realizó con 2,5 gramos de droga cruda, utilizando mezclas hidroalcohólicas al 50 % y 80 %, y agua destilada como disolvente. Las muestras se agitaron durante seis horas con un equipo Erweka y luego se filtraron. Cada extracto se desecó en una estufa Memmert a 105 °C por tres horas. Finalmente, las muestras se enfriaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron.

2.3. Obtención y control de calidad del extracto hidroalcohólico 80 % de *N. lappaceum* L

El extracto se obtuvo por maceración, utilizando una mezcla hidroalcohólica al 80 %, siguiendo la metodología descrita por Valdez-López *et al.* (2022) [10]. Las condiciones del proceso fueron durante 7 días, con agitación a 10 Hz (agitador magnético Cimarec – Barnstead / Thermolyne) y temperatura constante de 30 ± 2 °C. El extracto obtenido se conservó a temperatura ambiente y protegido de la luz.

El control de calidad del extracto se llevó a cabo por triplicado, siguiendo la metodología descrita en la norma NRSP 312 [11] y por Miranda y Cuellar (2000) [6], evaluando las propiedades organolépticas, densidad relativa, pH, índice de refracción-gradus brix y sólidos totales.

El análisis de la densidad relativa se llevó a cabo por picnometría y se empleó una balanza analítica Pioneer Ohaus de la serie PX224. El pH se determinó con un pH-metro digital de marca Bante, previa calibración y ajuste con soluciones buffer (Fisher Scientific, USA, Lote 190071). El índice de refracción y grado brix se determinó utilizando un refractómetro de la marca Anton Parr. En los sólidos totales, se transfirieron 5 mL de muestra a una cápsula de porcelana seca y tarada, se evaporaron en baño maría y se secaron a 105 ± 2 °C durante 3 horas. Tras enfriar en una desecadora, se pesaron las muestras. El secado se repitió por 60 minutos hasta obtener una masa constante.

2.4. Capacidad antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo)

La actividad de secuestro de radicales libres del extracto hidroalcohólico 80 % (*N. lappaceum* L.) se determinó siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams *et al.* en 1995 [12], con algunas modificaciones. Se añadieron 10 mL de solución etanólica, 200 µL de extracto hidroalcohólico y 3.8 mL de DPPH (0,1 mM) de Aldrich Co, St Louis, USA, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 517 nm con un espectrofotómetro (UV-Visible Evolution 201 Thermo Scientific, USA) en microceldas de 2 mL, usando metanol como blanco. El procedimiento se repitió tres veces, expresando el

resultado como capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de Aldrich® (St. Louis, MO, USA) por gramo. El porcentaje de inhibición del DPPH (% DPPH) se calculó con la fórmula: % de inhibición = (Abs control – Abs muestra/Abs control) × 100.

2.5. Diseño de la crema fitocosmética a partir de extracto hidroalcohólico (achotillo)

La selección de los componentes de la crema se basó en formulaciones típicas de emulsiones O/W descrita en la literatura [13, 14]. Se estableció un 5 % del extracto de achotillo, porcentaje en correspondencia con los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante y por Thilertdecha *et al.* (2020) [5]. Los componentes de las formulaciones y excipientes, fueron de calidad farmacéutica y se seleccionaron de acuerdo al tipo de preparación: cera autoemulsionable (polawax NF/MP-COSMETP-OL 0096); alcohol cetílico (MP-TECPOL 0020), aceite mineral (MP-ALIMLIQ 0007); ácido hialurónico 1%; benzoato de sodio (MP-ALIMPOL 0091) y aceite esencial de naranja (NSOC75826-16CO) todos del Laboratorio Cevallos S.A. de la ciudad de Guayaquil.

Para optimizar la formulación en función de su consistencia, se aplicó un diseño experimental de mezclas con restricciones de tres componentes: cera autoemulsionable proporción 3 – 6 %, alcohol cetílico 2–5 % y agua desionizada 69,57 – 74,60 %. Las variables respuesta fueron pH y extensibilidad. Se elaboraron en total 15 experimentos (Tabla 1), siete para estimar el modelo, tres para pérdida de ajuste y cinco restantes de réplicas. El estudio se realizó con ayuda del software Design-Expert versión 12 de 2019 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) [15]. Los modelos matemáticos de cada variable respuesta fueron seleccionados de acuerdo con las comparaciones de significación, pérdida de ajuste, precisión adeq, coeficientes de determinación R². Estos ensayos tuvieron en cuenta las características y restricciones de los componentes y las formulaciones fueron preparadas en orden aleatorio como lo indicó el software. Se elaboraron a escala de laboratorio 200 g de cada una.

Tabla 1. Diseño experimental de mezclas D-optimal de la crema fitocosmética O/W de *Nephelium lappaceum* L (achotillo). Extensibilidad y pH (24 – 72 horas).

Nº	A (%)	B (%)	C (%)	pH	Ext (mm)	pH	Ext (mm)
	Cera autoemulsionable	Alcohol cetílico	Agua purificada	24 h	24 h	72 h	72 h
1	5,83	3,00	70,77	4,80	31,32	4,75	30,67
2	6,00	3,98	69,61	4,59	31,84	4,55	30,51
3	3,00	3,34	73,25	4,97	32,33	4,95	30,50
4	3,97	4,96	70,67	4,80	22,32	4,80	20,82
5	5,03	5,00	69,57	4,74	24,17	4,70	23,02
6	5,03	5,00	69,57	5,09	21,50	5,07	20,54
7	6,00	3,98	69,61	4,80	21,22	4,84	19,50
8	4,27	3,26	72,07	4,72	22,11	4,75	19,38
9	4,27	3,26	72,07	4,76	23,78	4,77	20,70
10	4,27	3,26	72,07	5,04	22,48	5,09	21,92
11	4,50	3,50	71,06	4,73	23,26	4,73	21,93
12	5,67	2,00	71,92	4,95	22,75	5,00	20,55
13	4,28	2,00	73,32	5,08	23,55	5,12	21,36
14	3,00	4,70	71,90	4,95	32,74	4,99	30,48
15	3,00	2,00	74,60	5,03	34,35	5,00	32,69

Leyenda: A-B-C: componentes de la formulación y Ext: extensibilidad.

En la elaboración de las cremas, se partió de mezclar los componentes de la fase acuosa (A): agua purificada y benzoato de sodio. A parte, se preparó la fase oleosa (B): aceite mineral, cera autoemulsionante, alcohol cetílico, la cual se calentó hasta 70-75 °C y se agregó el ácido hialurónico hasta lograr una mezcla homogénea. Luego se transfirió la fase A, a la fase B con agitación continua. Al disminuir la temperatura, se agregó el extracto hidroalcohólico de achotillo y la esencia de menta mezclando a alta velocidad durante unos minutos hasta obtener una emulsión homogénea. Las cremas se envasaron en tarros de polipropileno y almacenaron en un lugar fresco y seco.

2.6. Evaluación de los parámetros físicos y químicos de la crema

En la evaluación de las formulaciones se tomó en cuenta el color, olor, consistencia, apariencia, pH y extensibilidad.

En la determinación del pH, se pesaron 0,5 g de crema y se disolvieron en 50 mL de agua destilada, luego de estar completamente mezclado, se llevó al pH-metro digital Bante 920. También se evaluó el área de extensibilidad, colocando como base un papel milimetrado, trazado con las coordenadas, que sirvieron como guía para determinar el área de extensibilidad. Posteriormente, se ubicó encima una placa de vidrio y en el centro se colocaron 2 g de cada formulación. Por último, se colocó cuidadosamente otra placa de vidrio de aproximadamente 380 g de peso. A los 5 minutos se midió con el calibrador de Vernier los diámetros de la elipse formada, siguiendo las coordenadas (4 direcciones). Todos los ensayos se realizaron por triplicado a una temperatura de 30 ± 2 °C y humedad relativa de 70 ± 5 %.

2.7. Optimización del diseño D-Optimal

En la optimización de las formulaciones se utilizó un procedimiento numérico del DX-11 y se asignó como criterios un pH entre 5 - 7 y la extensibilidad como objetivo 30,5 cm² con un máximo grado de importancia.

2.8. Evaluación sensorial de las formulaciones seleccionadas

Se realizó la evaluación sensorial con las formulaciones 8 y 13 mediante encuestas a 50 estudiantes de los semestres de noveno y décimo de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Técnica de Machala. Se aplicó una cantidad específica de las cremas seleccionadas en la parte frontal del antebrazo de los participantes. Se evaluaron diferentes criterios, efectos percibidos y atributos de las cremas tal como: olor (muy agradable, agradable, desagradable, muy desagradable), textura (ligera, cremosa, espesa, untuosa), absorción (rápida, lenta, deja sensación grasa, se absorbe completamente), sensación en la piel después de usar la crema (hidratada, suave, tersa, pegajosa, irritada), clasificación de la hidratación y la suavidad (1-5), preferencia entre las dos formulaciones y recomendarías algunas de las cremas a otro. Igual se consideró el género de los participantes, su tipo de piel y la frecuencia de uso de cremas cosméticas.

2.9. Escalado a nivel de planta piloto de la formulación 13

Se elaboraron tres lotes de 500 g de la formulación 13 donde se volvió a considerar parámetros de control de calidad tales como propiedades organolépticas, pH, extensibilidad y viscosidad. Todos los parámetros se evaluaron por triplicado.

La viscosidad de la crema se evaluó utilizando un viscosímetro Fungilab con serie ONEL 100220 a una temperatura constante de 25 °C. Se empleó un husillo (spindle) de tipo L3 y se estableció una velocidad de rotación de 20 rpm. Cada muestra utilizada en las pruebas tenía

un volumen de 250 mL. La medición de este parámetro se llevó a cabo 24 horas después de la elaboración de la crema inicial.

2.10. Evaluación preliminar de la estabilidad de la formulación 13

Ensayo de centrifugación: Se realizó a tiempo cero y a los tres días de su elaboración. La centrífuga utilizada fue el modelo LW Scientific Model E8 donde se colocó 5 g de muestra en el tubo de ensayo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 40 °C.

Test de ciclo stress congelación – descongelación: se exponen las cremas a cambios de temperatura controlada durante un periodo de 24 horas en el equipo de refrigeración de la marca Indurama modelo Frost free ERTT44. Durante este experimento, las muestras fueron sometidas a temperaturas extremas, comenzando desde -5°C durante el primer día y alcanzando 30 °C en el segundo día, manteniéndose en cada temperatura un día completo.

2.11. Control microbiológico

En el análisis microbiológico de la formulación 13 se siguió la norma INEN 2867 de 2015 [16] para productos cosméticos. Según esta norma, se establecieron los límites permitidos para el análisis microbiológico evaluando la presencia de microorganismos aerobios mesófilos totales durante 24 y 72 horas, hongos y levaduras, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, (no estén presentes)

2.12. Análisis de datos

Todos los datos fueron procesados en el software estadístico Jamovi versión 2.4.8.0. Las variables cuantitativas se expresaron como media/desviación estándar, y las variables cualitativas, en porcentaje y frecuencia. Se realizaron comparaciones mediante la prueba t de student, previo se verificó el cumplimiento de la distribución normal mediante la prueba Shapiro Will. Para buscar asociación significativa entre algunos parámetros en la evaluación sensorial se aplicó la prueba chi cuadrado y el Análisis Multivariado de Correspondencia Múltiple (ACM). El ACM se basó en los resultados que mostraron relación significativa al realizar el chi- cuadrado. En todos los análisis se consideró un nivel de significación $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la evaluación macromorfológico del fruto de Achotillo (*N. lappaceum* L.), las cáscaras presentaron un aspecto particular y distintivo, cubiertas de espinas suaves y flexibles que se distribuyen de manera uniforme en toda la superficie, con tonalidades entre rojizas y amarillentas. Al remover la cáscara, se revela la pulpa jugosa y translúcida con una textura suave con sabor dulce - ligeramente ácida. En el centro del fruto se encontró una semilla grande y brillante, de forma ovalada. En el análisis morfométrico se presentaron dimensiones similares al estudio realizado por Valdez-López *et al.* (2022) [10], con una longitud de 34,73/0,34 cm y un ancho de 27,93/0.32 (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas de los frutos de *N. Lappaceum* L., (n=100).

Fruto <i>Nephelium lappaceum</i> L.	$\bar{X}$ / DS	
	Longitud (cm)	Ancho (cm)
	34,73 / 0,34	27,93 / 0,32

3.1. Parámetros fisicoquímicos de la droga cruda de *Nephelium lappaceum* L

En el control de calidad de la droga cruda de las cáscaras de achotillo, el análisis granulométrico mostró un mayor porcentaje de sólidos retenidos en los tamices de diámetro 0,425 y 1,18 mm con 53,18 %. Un tamaño de partícula pequeño mejora la eficiencia de extracción, lo que conduce a un mayor contenido de sólidos totales. El tamaño de partícula promedio calculado fue de 0,54/0,01 mm, cercano al 0,5 mm recomendado por Valdez-López *et al.* (2022) [10], donde se evaluó las variables que influyen en el proceso extractivo del achotillo, mediante un diseño factorial fraccionado 5². En la tabla 3 se exponen algunos de los parámetros que fueron evaluados en la droga cruda de *N. lappaceum* L.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de la droga cruda de *N. lappaceum* L. (n=3)

Parámetros	Resultados $\bar{X}$ / DS
Tamaño de partícula (mm)	0,54 / 0,01
Humedad residual (%)	4,77 / 0,36
Sustancias solubles (%)	
• Sustancias solubles agua	33,05 / 0,04
• Sustancias solubles en etanol 50 %	29,59 / 0,01
• Sustancias solubles en etanol 80 %	64,52 / 0,02
Cenizas totales %	2,84 / 0,02

Leyenda: $\bar{X}$ / DS: media / desviación estándar

El método de secado del material vegetal se realizó siguiendo los criterios establecidos por Valdez-López *et al.* (2022) [10], que demostró que un secado a 50 °C en una estufa de recirculación de aire era efectivo para deshidratar el material vegetal de *Nephelium lappaceum* L., (cáscaras). Según Tsong *et al.* (2021) [4] y OMS (2011) [8], la humedad residual de un material vegetal es de 8 % a 14 % como máximo. El promedio estuvo debajo del valor máximo, indicando que el proceso de secado de las cáscaras de achotillo fue eficiente. Los resultados del estudio del contenido de sustancias solubles indican, que el menor poder extractivo se obtuvo con agua y etanol a 50 %. Por otro lado, la mezcla hidroalcohólica al 80 % fue la de mayor poder extractivo [10, 17]. El análisis de cenizas totales proporciona información sobre la presencia de impurezas inorgánicas como carbonatos, oxalatos y silicatos, según Karole *et al.* (2018) [18]. En el caso de las cenizas totales, se encontraron por debajo del límite máximo 5 % establecido por la European Farmacopeia [19, 20], dando como resultado 2,84 ± 0,02 %. Estos hallazgos concuerdan con estudios anteriores [10]. Finalmente, es importante destacar que este resultado sugiere que la cáscara del *Nephelium lappaceum* L., analizada presenta calidad y la idoneidad de esta droga vegetal.

3.2. Parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico

Se llevó a cabo un estudio comparativo del extracto hidroalcohólico al 80 % en relación con un estudio realizado por Valdez-López *et al.* (2022) [10] analizando varios parámetros fisicoquímicos, incluyendo propiedades organolépticas, pH, densidad relativa, índice de refracción, grados brix y sólidos totales, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del extracto de *N. lappaceum* L. ($n=3$)

Parámetros	Resultados $\bar{X}$ / DS	
	Extr. Hidroalcohólico 80%	Valdez López et al. (2022) [10]
Propiedades organolépticas	Líquido de color ámbar oscuro y olor característico	
pH	3,94 / 0,02	3,94 / 0,01
Densidad relativa (g/mL)	0,89 / 0,03	0,89 / 0,02
Índice de refracción	1,3520 / 0,001	1,36 / 0,001
Grados brix (%)	12,72 / 0,05	-
Sólidos totales (%)	8,05 / 0,35	8,53 / 0,16
DPPH (TEAC mg/g)	9,0603 / 0.0109	-

Leyenda: $\bar{X}$ / DS: media / desviación estándar, Extr: Extracto y TAEC: capacidad antioxidante equivalente a trolox.

En términos de propiedades organolépticas, se menciona que el extracto tiene un color ámbar oscuro y un olor característico. En los parámetros fisicoquímicos, se observa que el pH del extracto es ácido, lo cual, puede explicarse por la presencia de compuestos polifenólicos (ácidos: gálico, cafeico, cumárico, sirínico y eláxico), taninos flavonoides y saponinas. Según Bhat (2020) [21], la acidez en preparaciones de extractos puede estar relacionada con la presencia de estos compuestos.

En relación con el índice de refracción, los grados brix y la densidad relativa, se reportaron valores dentro de los rangos adecuado [22]. Mediante la prueba t de student con un nivel de significación del $\alpha=0,05$, no se encontraron diferencias significativas en los sólidos totales ($p=0,096$), densidad y pH ($p=0,100$) con los valores obtenidos por Valdez-López *et al.* (2022) [10]. Solo el índice de refracción mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,002$), lo cual puede estar condicionado por los diferentes equipos empleados en la determinación.

La actividad antioxidante por DPPH de cáscara de achotillo mostró un valor de $9,0603 \pm 0.0109$ este valor indica la cantidad de trolox equivalente por gramo de extracto de *Nephelium lappaceum*. Estas actividades antioxidantes se atribuyen a un mayor contenido de fenoles y flavonoides (elagitanino, ácido fenólico, quercetina y galotanino) [23, 24]. La ecuación obtenida para la cuantificación de DPPH (% de inhibición = $308.13 \times \text{concentración de trolox} - 3.6507$), demostró que existe una correlación positiva fuerte entre la concentración de trolox y el porcentaje de inhibición obtenido, con un coeficiente de correlación de 0,9912 y una significación $p < 0,001$. Finalmente, todos estos resultados demuestran que el extracto hidroalcohólico se encuentra en óptimas condiciones para el desarrollo de nuevos productos fitocosméticos.

3.3. Diseño experimental de la crema fitocosmética *Nephelium lappaceum* L

Para la optimización de las formulaciones se utilizó un diseño experimental de mezclas D-optimal, donde se identificaron tres componentes principales, cera autoemulsionable, alcohol cetílico y agua. Estas formulaciones ofrecieron consistencias variadas, presentando aspectos

homogéneos y físicamente estables durante el periodo de elaboración y almacenamiento. Los resultados de pH y extensibilidad a las 24 y 72 horas se encuentran en la tabla 1.

En el análisis de pH entre las 24 y 72 horas, el modelo que mejor se ajustó fue el lineal, sin embargo, no se ajustaron con la significación de $p=0,1689$, incluso con $R^2 = 0,2565$, a pesar de que se realizaron las transformaciones matemáticas para mejorar el ajuste. Sin embargo, la bondad de ajuste $p=0,1326$ si cumplió. El pH a las 24 horas osciló entre 4,59 - 5,09 y a las 72 horas entre 4,35 - 5,12, valores bastante cercanos, lo cual afectó el correcto ajuste del modelo. Los valores fueron ligeramente ácido, cercano al pH natural de la piel [25, 26], esta característica puede atribuirse a las propiedades ácidas propias del extracto y otros componentes presentes en la formulación.

Las ecuaciones y los parámetros de evaluación de los modelos para la variable respuesta de extensibilidad, se resumen en la tabla 5. La extensibilidad a las 24 y 72 horas se ajustó a modelos cuadráticos, con significación $p=0,0290$ y $0,0320$, valores de R^2 de $0,7829$ y $0,7558$, y R^2 ajustados de $0,5379$ y $0,5180$. En cuanto al Adeq de precisión (relación señal-ruido) los valores fueron $5,5443$ y $4,9846$, mayor que 4, indicando una señal adecuada por lo que los modelos pueden utilizarse para navegar por el espacio de diseño.

Los gráficos N-plot de la distribución normal de los residuos obtenidos mostraron que los puntos experimentales estuvieron cercano a la línea recta, lo que garantiza una distribución normal óptima de las formulaciones y los residuos.

Tabla 5. Modelos ajustados de extensibilidad (Ext.) del diseño D-Optimal, de la crema fitocosmética O/W a las 24 y 72 horas

Modelo ajustado	Sig. (p)	Pérdida de Ajuste	R^2	Precisión Adeq
Ext. 24 h.%= +248,58954 A -16,36270 B +1,31022 C -2,98669 A*B -3,52215 A*C +0,218816 B*C	0,0290	0,4900	0,7829	5,5443
Ext. 72 h.%= +251,64597 A -14,32682 B +1,31786 C -2,90433 A*B -3,57028 A*B +0,183400 B*C	0,0320	0,6300	0,7558	4,9846

Leyenda: Sig: significación p, Ext: extensibilidad, A: cera autoemulsionable, B: alcohol cetílico y C: agua.

Los resultados obtenidos en la extensibilidad de las 15 formulaciones se encontraron valores de $21,22$ a $34,35 \text{ cm}^2$ en 24 horas y $19,38$ a $32,72 \text{ cm}^2$ en 72 horas. El aumento de la consistencia y extensibilidad de las cremas en el intervalo de 24 a 72 horas puede atribuirse a varios factores clave como el reordenamiento de los componentes, la interacción entre los emulgentes y los estabilizantes en la formulación, permitiendo una redistribución más uniforme y mejor integración de los componentes lipofílicos e hidrofílicos [27, 28]. Estos valores son considerados ideales de acuerdo a su comportamiento reológico de las formulaciones cosméticas elaboradas [29].

En relación con los términos del modelo, A (x1), C (x2) y AC eran significativos para la predicción de la extensibilidad. Esto implica que la extensibilidad de la crema se ve afectada por la concentración de agua, la cera autoemulsionable y la interacción entre ambas variables. Como se puede observar en las figuras 1 que a medida que aumenta la concentración de agua, disminuye la cantidad de cera autoemulsionable, lo que resulta en un aumento en la extensibilidad. Estos resultados respaldan la relación entre los componentes y su capacidad para variar la consistencia de las cremas.

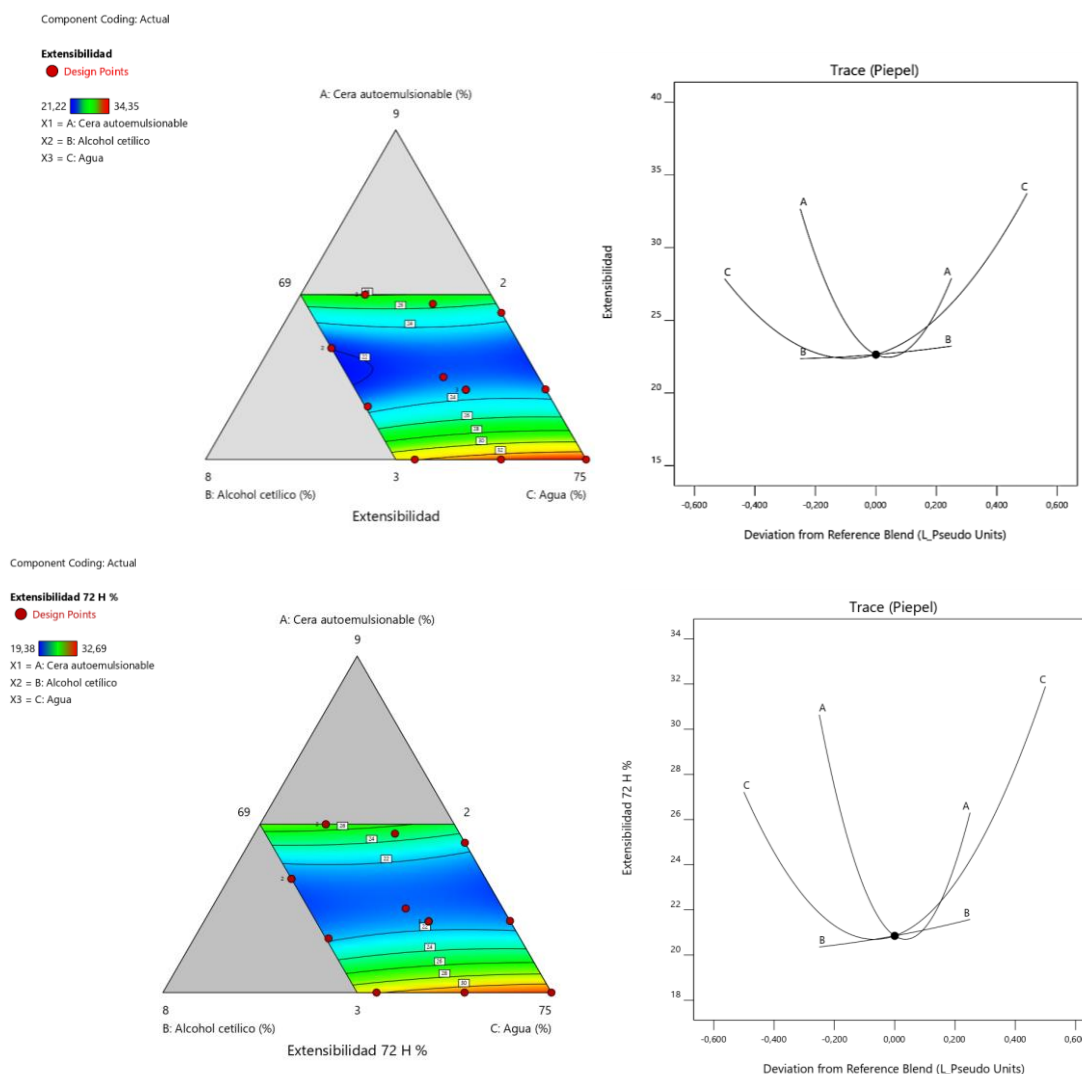


Figura 1. Modelo cuadrático, extensibilidad 24 horas a las 24 y 72 horas (gráficos de contorno y traza).

3.4. Optimización del diseño experimental

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos de las formulaciones óptimas, dos con un 100 % de deseabilidad, la 8 y la 13.

Tabla 6. Optimización de las formulaciones 8 y 13.

Nº	Cera Autoemulsionable	Alcohol Cetílico	Agua Purificada	pH	Ext.	Deseabilidad
8	4,27	3,26	72,07	4,72	22,11	1
13	4,28	2,00	73,32	5,08	23,55	1

3.5. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se realizó a las dos formulaciones óptimas del diseño (8 y 13) y se aplicó encuestas que evaluaron atributos como olor, textura, absorción, hidratación y sensación que deja la crema después de aplicarla. La muestra estuvo conformada por 50 estudiantes de los últimos semestres de la carrera de Bioquímica y Farmacia, 18 hombres (36 %) y 32 mujeres (64 %), la edad osciló entre 20 y 27 años (mediana=22). El 50 % (n=25) indicaron tener

piel mixta, 18 % seca, 16 % grasa y piel sensible el 16 %. De los encuestados, el 54 % (27 personas) utilizaban cremas cosméticas diariamente o semanalmente, 17 personas las usaban ocasionalmente (34 %) y 6 no las utilizaban en absoluto (12 %).

De manera general, la formulación 13 tuvo una preferencia clara entre los encuestados con un 70 % de aceptación en comparación con el 24 % para la formulación 8. En el estudio se realizó las comparaciones entre las formulaciones 8 y 13, mediante la prueba de chi cuadrado de muestras independientes, y se determinó que no había diferencias significativas en cuanto al: olor, absorción, hidratación y sensación ($p > 0,05$) de las dos formulaciones. Sin embargo, en el caso de la textura dio diferencias significativas con una de $p < 0,001$.

En la Figura 2 se detalla gráficamente los resultados del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de la variable que resultó significativa (textura) y las características demográficas y preferencia de la crema con la formulación 8 y 13. La gráfica en un plano bidimensional permite visualizar cómo se agrupan las variables de interés según su proximidad espacial. La dimensión uno, que tiene un alfa de Cronbach de 0,743, explica el 41,20 % de la varianza total, mientras que la dimensión 2, con un alfa de Cronbach de 0,431, resultando con una varianza total de 30,536 %. En conjunto, estas dos dimensiones explican el 71,70 % de la variación total en los datos. Esto sugiere que las variables incluidas en el modelo tienen una consistencia moderada en términos de su relación con las formulaciones cosméticas 8 y 13.

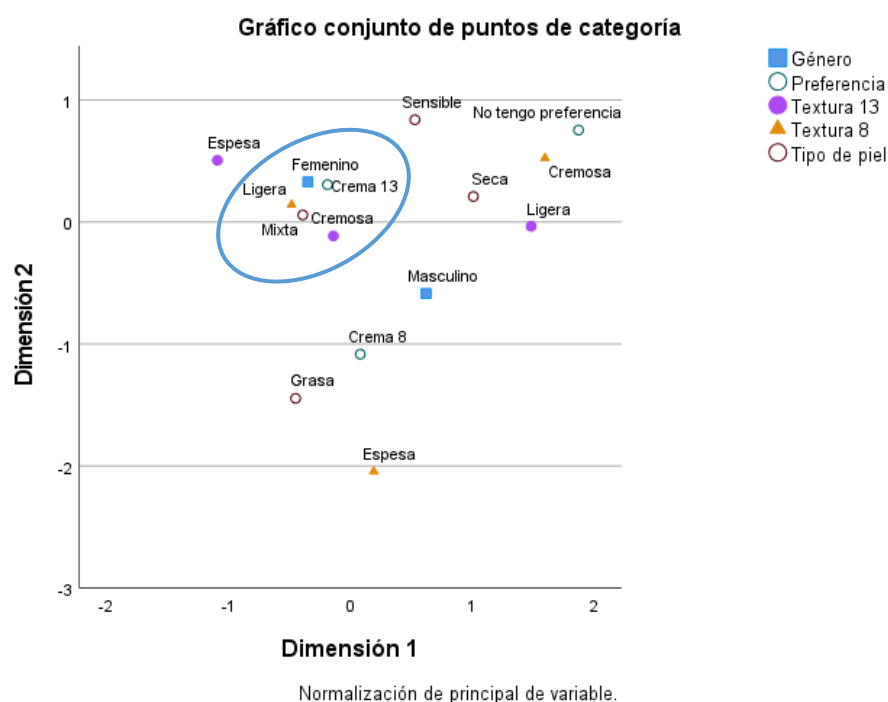


Figura 2. Análisis de correspondencia múltiple de las variables significativas de acuerdo con la textura, tipo de piel y género en función de la crema fitocosmética.

En cuanto a las variables relacionadas con la textura, se encontró que los puntos más cercanos a la formulación 13 se ubicaron en el aspecto cremoso y ligero. Respecto al tipo de piel, se evaluó que la mayoría de los encuestados tenían piel mixta. Además, el uso de cremas cosméticas se inclina mayormente en mujeres que en hombres. Estos resultados están en línea con otros estudios que han encontrado que las mujeres tienden a ser más conscientes de su piel y usar productos de cuidado de la piel que los hombres [30].

Estos resultados respaldan que las formulaciones y las variables relacionadas con la textura y el tipo de piel, se encontró que la formulación 13 tuvo una preferencia clara entre los encuestados, lo que sugiere que la textura y el tipo de piel son factores importantes para considerar en la formulación de cremas cosméticas para garantizar la preferencia del consumidor.

3.6. Escalado a nivel de planta piloto de la formulación 13

La selección final se realizó combinando los resultados de la evaluación sensorial y las formulaciones seleccionadas por el modelo. Se elaboraron tres lotes de la formulación 13, las cremas presentaron propiedades organolépticas adecuadas, un olor agradable y un color palo rosa. Su textura fue suave dejando un aspecto hidratante y de rápida absorción al contacto de la piel, y lo más importante, no dejaba una sensación incomoda grasosa.

En tabla 7 se detallan los resultados de pH, extensibilidad y viscosidad de las cremas. El análisis de pH se realizó a las 24 horas sin variaciones significativas que afectaran la calidad general de la crema. Los valores observados fueron de 5,10, lo que indica una afinidad con la piel, siendo potencialmente no irritante, considerando que el gradiente de pH varía de aproximadamente 4 a 6 en la superficie de la piel [31]. En cuanto la extensibilidad se mantiene dentro del mismo rango, por lo que la crema tiene una adecuada distribución uniforme o capacidad de esparcimiento en la piel, y no presenta grumos.

Tabla 7. pH, extensibilidad y viscosidad de los tres lotes de cremas de *N. lappaceum* L. (n=3).

Lotes	Resultados $\bar{X}$ / DS		
	pH	Ext. (mm)	Viscosidad (cP)
1	5,10 / 0,02	25,90 / 0,35	4353,80
2	5,10 / 0,02	26,07 / 0,31	3969,97
3	5,10 / 0,02	25,60 / 0,30	4452,80
Leyenda: $\bar{X}$ / DS: Media / desviación estándar, Ext: extensibilidad			

El análisis de viscosidad de las formulaciones, realizado al inicio del estudio, no mostró cambios significativos, por lo que se encontró dentro de los rangos que son entre 4000 a 18000 centipoises, por lo que permite que la crema mantenga su forma y cohesión, evitando que se escurra o sea demasiado densa para aplica [32].

3.7. Estudio de estabilidad preliminar

La centrifugación de las formulaciones de los lotes correspondientes nos permitió verificar la estabilidad de los sistemas emulsionados preservando los aspectos homogéneos, con el fin, de acelerar los procesos de inestabilidad para predecir la posibilidad de separación de fases de las formulaciones cosméticas elaboradas [33]. En el tiempo cero, todas las cremas mostraron estabilidad macroscópica, con apariencia brillante y homogénea. Después de la centrifugación no hubo separación de fase en la muestra, lo que indica de manera preliminar que la formulación es aparentemente estable.

Por otra parte, las cremas permanecieron sin cambios durante el período de estudio a una temperatura de -5 °C se mostró que la crema tenía textura un poco rígida con formación de hielo. Después del proceso de descongelación las formulaciones retomaron su consistencia, el color y el olor se mantuvieron. Al final del estudio, no hubo intensificación de este aspecto, y la formulación aún presentaba un aspecto homogéneo, pero sin brillo.

3.8. Control de calidad microbiológico de la crema fitocosmética

En la tabla 8 se muestran los resultados de los ensayos microbiológicos en la crema fitocosmética de achotillo donde no se observó ningún tipo de crecimiento bacteriano a lo largo de los periodos de siembra en los cultivos, que abarcaron 24 y 72 horas, requisito fundamental de un producto cosmético.

Tabla 8. Control microbiológico de los lotes de la crema cosmética de *Nephelium lappaceum* L (achotillo).

Análisis microbiológico	Resultados	Rango Referencial (UFC/g)
Microorganismos aerobios mesófilos totales	Negativo	≤ 100
Hongos y levaduras	Negativo	< 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Ausencia

4. CONCLUSIONES

Con el estudio realizado se demostró la factibilidad de diseñar un nuevo producto cosmético a partir de un extracto hidroalcohólico de la cáscara de *Nephelium lappaceum* L (achotillo), producto natural, empleando herramientas estadísticas de diseño experimental que permitieron optimizar los componentes en las formulaciones.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar conflictos de interés

REFERENCIAS

1. M. E. Manful, L. Ahmed & C. Barry-Ryan. Cosmetic formulations from natural sources: Safety considerations and legislative frameworks in the European Union. *Cosmetics*, **11**(3) 72 (2024). Doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics11030072>
2. I. Dini & S. Laneri. The new challenge of green cosmetics: Natural food ingredients for cosmetic formulations. *Molecules*, **26**(13), 3921 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26133921>
3. A.S. Santos, A.K. Oliveira, R.O. Pereira, E.V. Junior, A.L. Sayão & A.M. Silva. Composition and biological properties of Rambutan (*Nephelium lappaceum*), En: D.N. Chauhan & K. Shah (editors). *Phytopharmaceuticals: Potential Therapeutic Applications*. Scrivener Publishing LLC, Beverly, 2021; Vol. 21, pp. 403–436.
4. J.L. Tsong, L.P.W. Goh, J.A. Gansau & S.-E. How. Review of *Nephelium Lappaceum* and *Nephelium Ramboutan-Ake*: A high potential supplement. *Molecules*, **26**(22), 7005 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26227005>
5. N. Thitilertdech, P. Chaiwut & N. Saewan. *In vitro* antioxidant potential of *Nephelium lappaceum* L. rind extracts and geraniin on human epidermal keratinocytes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **23**, 101482 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101482>
6. M. Miranda & A. Cuellar. *Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales*. Editorial Universidad de la Habana, La Habana, 2000; p. 34.
7. USP 43-NF 38. *United States Pharmacopeia and National Formulary*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2020; Vol. 1, p. 1010.

8. World Health Organization. *Quality Control Methods for Herbal Materials*. WHO Press, Geneva, 2011; p. 5.
9. R. Martínez-Pacheco. *Tratado de Tecnología Farmacéutica. Sistemas Farmacéuticos*. Síntesis, Madrid, 2016; Vol. 1, p. 54.
10. L. Valdez-López, Y. Gutiérrez-Gaitén, V. García-Mir & O. Nieto-Acosta. Caracterización del proceso extractivo por maceración mediante un diseño factorial fraccionado en *Nephelium lappaceum* L. *Rev. Cubana Farm.*, **55**(3), e738 (2022). URL: <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/738>
11. NRSP 312 Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo, La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1992.
12. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier & C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, **28**(1), 25–30 (1995). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
13. M. Sekar, P. Sivalingam & A. Mahmad. Formulation and evaluation of novel antiaging cream containing rambutan fruits extract. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **8**(3), 1056–1065 (2017). Doi: [http://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.8\(3\).1056-65](http://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.8(3).1056-65)
14. T. Sahu, T. Patel, S. Sahu & B. Gidwani. Skin cream as topical drug delivery system: A review. *J. Pharm. Biol. Sci.*, **4**(5), 149–154 (2016). URL: <https://www.proquest.com/docview/2493569021?sourcetype=Scholarly%20Journals>
15. Y. Li, D. Raghavarao & I. Chervoneva. Extensions of D-optimal minimal designs for symmetric mixture models. *Commun. Stat. Theory Methods*, **46**(5), 2542–2558 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1080/03610926.2014.988258>
16. Servicio Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 2867 (2015-03): Productos Cosméticos. Requisitos. Quito, 2015. URL: <https://www.oficial.ec/resolucion-15-057-nte-inen-2867-apruebanse-oficializanse-caracter-obligatorios-voluntarios-productos>
17. N.N.M. Phuong, T.T. Le, M.Q. Dang, J. Van Camp & K. Raes. Selection of extraction conditions of phenolic compounds from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel. *Food and Bioprod. Process.*, **122**, 222–229 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.008>
18. S. Karole, G. Gautam & S. Gupta. Physicochemical, qualitative and quantitative phytochemical analysis of the leaf and bark of *Bombax Ceiba* L (red silk cotton tree). *J. Drug Deliv. Therap.*, **8**(6-s), 105–110 (2018). Doi: <http://doi.org/10.22270/jddt.v8i6-s.2094>
19. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. *European Pharmacopoeia*, 11th ed., 2022.
20. A.S. Bouin & M. Wierer. Quality standards of the European Pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.*, **158**(Part B), 454–457 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.020>
21. R. Bhat. Bioactive Compounds of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). En: H. Murthy & V. Bapat, (editores). *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*. Reference Series in Phytochemistry, Springer, Cham, 2020; pp. 145–156. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30182-8_4
22. H. J. Shin, S. W. Choi & G. Ok. Qualitative identification of food materials by complex refractive index mapping in the terahertz range. *Food Chem.*, **245**, 282–288 (2018) Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.056>
23. A. Mendez-Flores, A. Hernández-Almanza, A. Sáenz-Galindo, J. Morlett-Chávez, C. N. Aguilar & J. Ascacio-Valdés. Ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican variety) husk. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **11**(12), 676–681 (2018). Doi: <https://doi.org/10.4103/1995-7645.248339>
24. A.K. Yunusa, N. Abdullahi, A. Rilwan, A.R. Abdulkadir & A. Dandago. DPPH Radical scavenging activity and total phenolic content of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peel and seed. *Annals. Food Sci. Technol.*, **19**(4), 774–779 (2018). URL: https://www.researchgate.net/publication/331414361_DPPH_RADICAL_SCAVENGING_ACTIVITY_AND_TOTAL_PHENOLIC_CONTENT_OF_RAMBUTAN_Nephelium_lappaceum_PEEL_AND_SEED

25. H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk & P. Finkel. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **28**(5), 359-370 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>
26. M.-H. Schmid-Wendtner & H. C. Korting. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**(6), 296–302 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1159/000094670>
27. M.E. Aulton & K.M. Taylor. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, 5th ed., Elsevier, London, 2018. p. 224.
28. Y. Del Río-Ortuño, S. Streitenberger-Jacobi, R. Bermejo-Fernández & F. Marin-Iniesta. Estabilidad en cremas con ingredientes de origen vegetal. *An. Vet. (Murcia)*, **36**, 1-21 (2022). Doi: <https://doi.org/10.6018/analesvet.541121>
29. D.A. Adejokun & K. Dodou. Quantitative sensory interpretation of rheological parameters of a cream formulation. *Cosmetics*, **7**(1), 2 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics7010002>
30. M.L. Mitterer-Daltoé, V.B. Martins, C.R.B. Parabocz & M.A.A. da Cunha. Use of cosmetic creams and perception of natural and eco-friendly products by women: The role of sociodemographic factors. *Cosmetics*, **10**(3), 78 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10030078>
31. M. Lukić, I. Pantelić & S.D. Savić. Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products. *Cosmetics*, **8**(3), 69 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069> <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>
32. G. Dijobie, R.K. Tsatsop, T.F. Mbam, V. Bama, B. Bamseck, S. Dongmo & M.B. Mbam. Multi-response optimization in the formulation of a topical cream from natural ingredients. *Cosmetics*, **5**(1), 7 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010007>
33. M. Gandomkar, A. Pasdaran & G. Yousefi. Development of an anti-acne cream based on natural oils: Investigation of the effect of ingredients on rheology, texture properties, and physical stability. *Trends Pharm. Sci.*, **9**(2), 93-104 (2023). URL: https://tips.sums.ac.ir/article_49328.html

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

G.J. Palacios-Velepucha, K.E. Vargas-González, V. García-Mir, L.L. Valdez-López & Y.I. Gutiérrez-Gaitén. Diseño de una crema fitocosmética a partir del extracto de cáscara de *Nephelium lappaceum* L. aplicando un diseño de mezcla. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **54**(1), 286–301 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116703>

Prescripción de antimicrobianos en el hospital infantil sur “Antonio María Beguez Cesar”, Santiago de Cuba, Cuba, 2024

Luisa María Boizant Crombet^a, Leidys Guibert Basto^b, Rober Luis Mora Poll^c, Marielia Sell Lluveras^d & Yaima Palay Justiz^e

Hospital Infantil Sur “Antonio María Beguez Cesar”, Santiago de Cuba, Cuba

Correos electrónicos:

^a luisamboizantc@gmail.com

^b leidysguibertbasto@gmail.com

^c rober.kcho@gmail.com

^d nenitasell@gmail.com

ORCID IDs:

^a <https://orcid.org/0009-0002-7957-6733>

^b <https://orcid.org/0000-0003-1316-6651>

^c <https://orcid.org/0009-0001-5826-9358>

^e <https://orcid.org/0000-0002-2422-9892>

Recibido: 2 de agosto de 2024

Corregido: 6 de febrero de 2025

Aceptado: 13 de febrero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116079>

RESUMEN

Objetivos: Caracterizar la prescripción de antimicrobianos de amplio espectro en el hospital infantil sur “Dr. Antonio María Beguez Cesar”, en el primer semestre de 2024. **Materiales y métodos:** Es un estudio de utilización de medicamentos prescripción indicación de antimicrobianos donde se selecciona un fármaco o grupo de fármacos y se analizan las indicaciones para las que se prescriben. Las variables estudiadas de las recetas fueron: principio(s) activo(s) de los medicamentos, diagnóstico clínico, dosis y cantidad. Estas prescripciones fueron analizadas desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Se identificaron algunos patrones de prescripción inadecuados: Prescripción extravagante, prescripción insuficiente, sobreutilización absoluta y sobreutilización relativa. La posología se consideró adecuada o inadecuada según las recomendaciones de nuestro formulario nacional de medicamentos. **Resultados:** Los más prescritos fueron: ceftriaxona, trifamox y meropenem en ese orden. Con respecto a las indicaciones: neumonía adquirida en la comunidad, neumonía asociada a los cuidados sanitarios y post operatorio complicado como las de mayor frecuencia de aparición. La posología de estos antimicrobianos está en su mayoría dentro los rangos recomendados. Con respecto a las prescripciones inadecuadas encontramos un total de 33 para un 2,28%. **Conclusiones:** La prescripción de antibióticos de amplio espectro es adecuada en general, los antibióticos prescritos y las indicaciones para las que estos se prescriben están en correspondencia con los estándares internacionales.

Palabras claves: antimicrobianos; prescripción; pediatría.

SUMMARY

Antimicrobial prescription at the “Antonio María Beguez Cesar” South Children's Hospital, Santiago de Cuba, Cuba, 2024

Objectives: To characterize the prescription of broad-spectrum antimicrobials in the “Dr. Antonio María Beguez Cesar” children's hospital in the first half of 2024. **Materials and methods:** It is a study of the use of antimicrobial prescription medications where a drug or group of drugs is selected and the indications for which they are prescribed are analyzed. The variables studied in the prescriptions were: active ingredient(s) of the medications, clinical diagnosis, dose and quantity. These prescriptions were analyzed from a quantitative and qualitative point of view. Some inappropriate prescription patterns were identified: Extravagant prescription, insufficient prescription, absolute overuse and relative overuse. The dosage was considered adequate or inadequate according to the recommendations of our national drug formulary. **Results:** The most prescribed were: ceftriaxone, trifamox and meropenem in that order. Regarding the indications: community-acquired pneumonia, healthcare-associated pneumonia and complicated postoperative period are the most frequent. The dosage of these antimicrobials is mostly within the recommended ranges. Regarding inappropriate prescriptions, we found a total of 33 for 2.28%. **Conclusions:** The prescription of broad-spectrum antibiotics is generally adequate, the antibiotics prescribed and the indications for which they are prescribed are in accordance with international standards.

Keywords: antimicrobials; prescription; pediatrics.

RESUMO

Prescrição de antimicrobianos no Hospital Infantil Sul “Antonio María Beguez Cesar”, Santiago de Cuba, Cuba, 2024

Objetivos: Caracterizar a prescrição de antimicrobianos de amplo espectro no Hospital Infantil Sul “Dr. Antonio María Beguez Cesar” no primeiro semestre de 2024. **Materiais e métodos:** É um estudo do uso de medicamentos prescritos e indicações de antimicrobianos onde um medicamento ou grupo de medicamentos é selecionado e as indicações para as quais são prescritos são analisadas. As variáveis estudadas nas prescrições foram: princípio(s) ativo(s) dos medicamentos, diagnóstico clínico, dose e quantidade. Essas prescrições foram analisadas do ponto de vista quantitativo e qualitativo. Alguns padrões de prescrição inadequados foram identificados: prescrição extravagante, prescrição insuficiente, superutilização absoluta e superutilização relativa. A dosagem foi considerada adequada ou inadequada de acordo com as recomendações do nosso formulário nacional de medicamentos. **Resultados:** Os mais prescritos foram: ceftriaxona, trifamox e meropenem, nessa ordem. Quanto às indicações: pneumonia adquirida na comunidade, pneumonia associada à assistência à saúde e pneumonia pós-operatória complicada são as mais frequentes. A dosagem desses antimicrobianos está, em sua maioria, dentro das faixas recomendadas. Em relação às prescrições inapropriadas, encontramos um total de 33, o que representa 2,28%. **Conclusões:** A prescrição de antibióticos de amplo espectro é geralmente apropriada; os antibióticos prescritos e as indicações para as quais são prescritos estão de acordo com os padrões internacionais.

Palavras-chave: antimicrobianos; prescrição; pediatria.

1. INTRODUCCIÓN

El uso inapropiado de antibióticos: genera una exposición innecesaria a posibles efectos adversos del fármaco, contribuye al incremento de las resistencias (en el propio paciente y en la comunidad), genera costes y cimenta la falsa creencia en la población sobre la habitual necesidad de su uso para obtener la curación [1]. El tratamiento correcto de las infecciones más frecuentes es de vital importancia, pues su incorrecto manejo conllevará un perjuicio para un gran número de pacientes [2]. Con frecuencia, los niños, una parte importante de la población,

reciben prescripción de antibióticos, empleándose hasta en el 60% de las ocasiones como farmacoterapia para las infecciones del tracto respiratorio superior, que constituyen la principal enfermedad de la infancia. Dichas infecciones en muchas ocasiones suelen ser de origen viral, aun cuando, se presenten con un exudado nasal mucopurulento tras el período catarral, por lo que, no debe considerarse una sobreinfección bacteriana si estos síntomas son de evolución benigna y autolimitada, no requiriendo para ello, la antibioticoterapia [3]. El uso irracional de antibióticos para infecciones respiratorias puede alcanzar hasta un 50% de los casos tratados, incrementando el gasto sanitario y generando el desarrollo de resistencia bacteriana, que constituye en la actualidad un problema de salud mundial y particularmente importante en pediatría, ya que son los niños menores de 5 años, los pacientes con mayor prescripción antibiótica [4].

Los antimicrobianos forman parte de la familia de fármacos más comúnmente prescritos. Algunos estudios revelan que los profesionales de la salud, generalmente, prescriben antimicrobianos en exceso, ya sea por solicitud de los propios pacientes, por carecer del tiempo adecuado para disuadirlos acerca de lo innecesarios que son estos fármacos en ciertas circunstancias o por la preocupación acerca de la certeza de su impresión diagnóstica [5].

Por causa del uso inadecuado de antibióticos, organismos antes susceptibles a antimicrobianos de uso común ahora son resistentes. Por ejemplo, en los Estados Unidos y en países de Latinoamérica, la prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina (SPRP) varió de 3,8 % en el año 1980, hasta 45 % según los últimos informes [6].

Actualmente, en Cuba se utilizan antimicrobianos en 20 % de los casos atendidos de manera ambulatoria y en un 40 % de los enfermos que requieren hospitalización; la mayoría de los que son prescritos no son necesarios o se administran en dosis inapropiadas [6]. En otro estudio realizado en el hospital infantil norte de nuestra ciudad, se evidencia también un uso inapropiado de antimicrobianos [7]. Ante este panorama y dada a no existencia de publicaciones previas sobre la prescripción de antimicrobianos en nuestro hospital, decidimos realizar esta investigación.

1.1. Objetivos

General: Caracterizar la prescripción de antimicrobianos de amplio espectro en el hospital infantil sur “Dr. Antonio María Beguez Cesar”, en el primer semestre de 2024. **Específicos:** Mostrar las indicaciones para las que son prescritas los antimicrobianos de amplio espectro. Describir las dosis prescritas de estos antimicrobianos. Detectar patrones de prescripción inadecuados

2. MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, retrolectivo. Es un estudio de utilización de medicamentos (EUM) de prescripción indicación de antimicrobianos donde se selecciona un fármaco o grupo de fármacos y se analizan las indicaciones para las que se prescriben.

Se revisaron todas las recetas de antimicrobianos prescritas entre enero y julio de 2024, en el hospital infantil sur de Santiago de Cuba.

Las variables estudiadas de las recetas fueron: principio(s) activo(s) de los medicamentos, diagnóstico clínico, dosis y cantidad. Estas prescripciones fueron analizadas desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Se identificaron algunos patrones de prescripción inadecuados [8]:

Prescripción extravagante: Utilizar medicamentos costosos, para los cuales existen alternativas más económicas.

Prescripción insuficiente: Uso de dosis menor a la mínima eficaz necesaria o recomendada (corresponde también a mal uso del fármaco).

Sobreutilización absoluta: Uso de un fármaco cuando el paciente definitivamente no lo requiere para su condición clínica, o tiene una contraindicación para el uso del mismo.

Sobreutilización relativa: Empleo preferente de un fármaco útil para la indicación clínica, pero para la cual existen otras alternativas consideradas de primera elección.

La posología se consideró adecuada o inadecuada según las recomendaciones de nuestro formulario nacional de medicamentos [9].

2.1. Análisis estadístico

Para la agrupación y análisis de los resultados se utilizó el Software SPSS Versión 21.0 para Windows. Para el análisis de la información se calcularon porcentajes para variables cualitativas y valores promedio de la variable cuantitativa

3. RESULTADOS

Se revisaron 1447 recetas de antimicrobianos de amplio espectro prescritos de enero a junio, 2024 en el hospital infantil sur de Santiago de Cuba. Los más prescritos fueron: ceftriaxona, trifamox y meropenem en ese orden, como puede observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Antimicrobianos de amplio espectro prescritos. Hospital infantil sur “Dr. Antonio María Baguez Cesar”. Enero-julio/2024

Antimicrobianos	No	%
Levofloxacin (J01MA12)	39	2,69
Piperacilina + tazobactam (J01CR05 P1)	8	0,55
Cefixima (J01DD08)	26	1,79
Vancomicina (J01XA01)	88	6,08
Ceftazidima (J01DD02)	69	4,77
Ceftriaxona (J01DD04)	631	43,6
Meropenem (J01DH02)	149	10,3
Fosfomicina (J01XX01)	134	9,26
Amoxicilina + sulbactam (J01CR02 P2)	259	17,9
Cefepima (J01DE01)	44	3,04
Total	1447	100

Fuente: recetas de antimicrobianos prescritas

Con respecto a las indicaciones para las que se prescribieron estos antimicrobianos tenemos: neumonía adquirida en la comunidad, neumonía asociada a los cuidados sanitarios en segundo lugar y post operatorio complicado como las de mayor frecuencia de aparición, según se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de frecuencias de las principales indicaciones para las que se prescriben los antimicrobianos de amplio espectro. Hospital infantil sur “Dr. Antonio María Buequez Cesar”. Enero-julio/2024.

Indicaciones	Nº	%
Neumonía asociada a los cuidados sanitarios	146	10,08
Post operatorio complicado	119	8,22
Infección urinaria complicada	21	1,45
OMA por pseudomonas	6	0,41
Profilaxis perioperatoria	82	5,66
Abceso intraabdominal	6	5,66
PL fallida	26	1,8
EDA bacteriana	57	1,79
Abceso periamigdalino	28	1,93
Neumonía adquirida en la comunidad	321	22,2
Osteomielitis	36	2,48
Síndrome torácico	68	4,7
Faringoamigdalitis aguda purulenta	118	8,15
Forunculo nasal	22	1,52
Mordedura de perro	7	0,48
Meningoencefalitis bacteriana	104	7,19
Fibrosis quística	96	6,63
Shock séptico	8	0,55
Peritonitis	13	0,9
Onfalitis	2	0,14
Carcinoma infectado	5	0,34
Impetigo contagioso	7	0,48
OMA	67	4,63
Infecciones de partes blandas	82	5,67
Total	1447	100

Fuente: recetas de antimicrobianos prescritas

Las dosis y posología de estos antimicrobianos se encontraba dentro los rangos recomendados según indicación, ya sea terapéutica o profiláctica. Con respecto a las prescripciones inadecuadas encontramos un total de 33 para un 2,28% como se observa en la Figura 1.

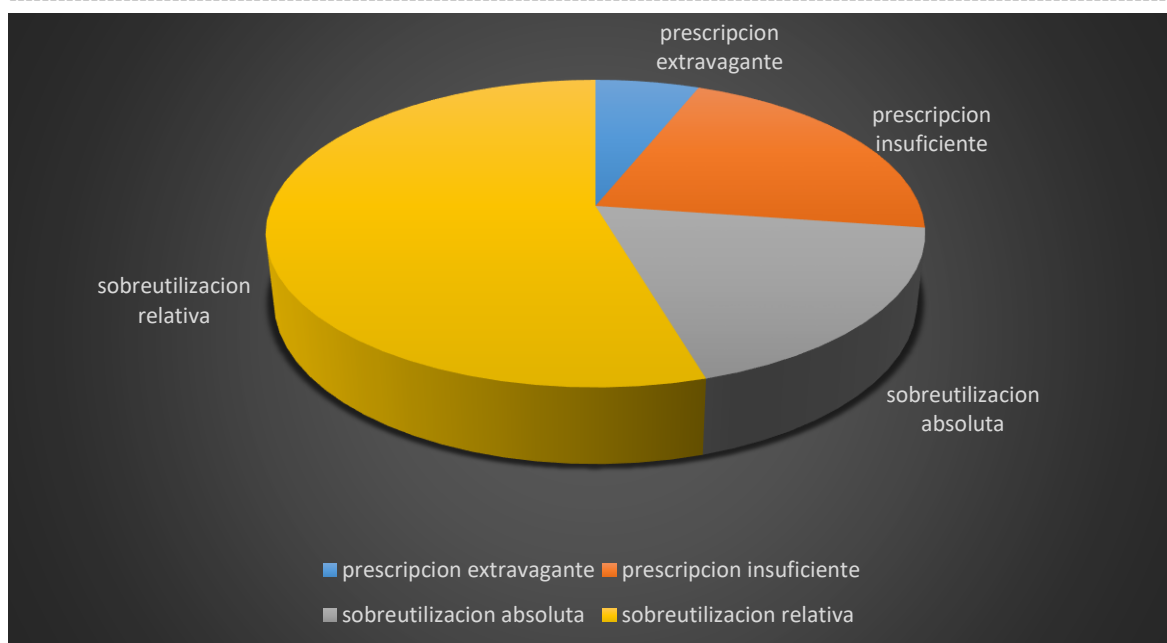


Figura 1. Tipos de prescripciones inadecuadas. Hospital infantil sur “Dr. Antonio María Bueguez Cesar”. Enero-julio/2024.

Distribuidas de la siguiente forma:

Prescripción extravagante: Cefepima para tratar 2 pacientes con piodermitis, representa el 0,1% del total de las prescripciones realizadas en el periodo analizado.

Prescripción insuficiente: Representaron el 0,48% de las prescripciones y fueron: Cefixime en dosis inferior a 8 mg/kg/día para tratar 2 pacientes uno con piodermitis y otro con neumonía atípica, Prescripción de ceftriaxona a dosis de 20 mg/kg/día para 5 pacientes en profilaxis perioperatoria, así como 4 pacientes con osteomielitis se usó a 10 mg/kg/día, estos pacientes pesaban más de 50 kg.

Sobreutilización absoluta: Observamos 6 (0,41%). Se prescribió amoxicilina + sulbactam para profilaxis quirúrgica y Cefixime para un paciente con neumonía atípica.

Sobreutilización relativa: Fueron 18 (1,24%) porque se prescribió Fosfomicina para tratar otitis media aguda en 13 pacientes, Ceftazidima para tratar 2 pacientes con absceso corneal y Cefixima para profilaxis perioperatoria en 3 pacientes.

4. DISCUSIÓN

La prescripción de cefalosporinas de tercera generación, específicamente ceftriaxona, que prevaleció en nuestro estudio probablemente porque está recomendado en el tratamiento de las infecciones respiratorias bajas, meningococcal bacteriana y en la profilaxis perioperatoria de varios tipos de cirugías, estas indicaciones fueron las de mayor prevalencia en nuestro estudio. Similar a lo encontrado por Herrero *et al.* en 2015 hospital infantil norte de nuestra ciudad, donde predominaron penicilinas y cefalosporinas como antimicrobianos más prescritos [6], similar resultado se encontró en el artículo de Rodríguez-Sánchez en el hospital de Morón donde el 41,23% del total de antibióticos prescritos en el servicio de pediatría fue ceftriaxona [9].

Los motivos de prescripción de antimicrobianos que encontramos en nuestro estudio son similares a los encontrados por Rincón-Alarcón *et al.* que identificaron cinco diagnósticos, siendo las infecciones respiratorias superiores, las reportadas con mayor frecuencia y entre

estas, la más prevalente, resultó ser la amigdalitis [5]. Coincidiendo con Cando-Punguil *et al.* que tuvieron mayor incidencia los procesos infecciosos respiratorios con el 76,9% de los casos, identificando a la amigdalitis como la patología que afecta en mayor proporción con el 42,8% [10]. En un hospital pediátrico de México se incluyeron 110 pacientes entre uno y tres años de edad. La infección de vías aéreas inferiores más frecuente fue la neumonía (69,09%), en un menor porcentaje la bronquiolitis (1,81%) [1].

El Cefepima es la única cefalosporina de cuarta generación disponible en nuestro país, tiene actividad bactericida sobre numerosos microorganismos gram-positivos, gramnegativos y enterobacteriáceas [11], y aunque está indicado en el tratamiento de las infecciones de piel como la piodermitis, si existe disponibilidad de otros antibióticos antiestafilococcicos como verse en la Tabla 1 de nuestro estudio, no debe seleccionarse el Cefepima como la primera opción, debería reservarse para pacientes con infecciones graves o de difícil manejo. Las prescripciones insuficientes se debieron a uso de dosis subterapéuticas de los antibióticos antes descritos en resultados [12]. Las cefalosporinas constituyen la indicación habitual en la profilaxis quirúrgica, especialmente la cefazolina porque es razonablemente segura, tiene una vida media larga, se puede administrar en bolos, no interacciona con otras drogas, no favorece la aparición de resistencias y no es cara [13]. Por lo que prescribir trifamox para esta indicación no es adecuado, como no lo es tampoco la prescripción de cefixima para el tratamiento de un paciente con neumonía atípica, dado que esta enfermedad es producida por microorganismos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, microorganismos sensibles a los macrólidos como azitromicina y Claritromicina, la azitromicina es activa contra muchos organismos grampositivos, incluidos *Streptococcus pneumoniae* susceptibles a la eritromicina, estreptococos de los grupos A, B, C y G, y *Staphylococcus aureus* susceptibles a la meticilina. En comparación con la eritromicina, la azitromicina ha expandido la actividad contra organismos gramnegativos susceptibles, incluidos *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* y *Bordetella pertussis* [14]. Son los antibióticos recomendados en protocolos nacionales e internacionales basados en las evidencias disponibles [14].

Dado que la amoxicilina es el antibiótico de elección en el tratamiento de la otitis media aguda esta entidad es producida frecuentemente por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* (no tipable) y EBHGA microorganismos sensibles a este antibiótico, el cual además existen evidencias de su efectividad la prescripción de Fosfomicina constituyo una sobreutilización relativa en nuestro estudio, para el tratamiento de la celulitis orbitaria, los protocolos de la OPS recomiendan como primera opción: ceftriaxona 100 mg/kg/iv/d en una dosis c/24 h o cefotaxima 200 mg/kg/iv/d fraccionados en cuatro dosis (c/6 h) + oxacilina 200 mg/kg/ iv/d fraccionados en cuatro dosis (c/6 h) por 7 a 10 d. Otras opciones: amoxicilina/clavulanato o amoxicilina/sulbactam 100 mg/kg/ iv/d (de amoxicilina) fraccionados en tres dosis (c/8 h) o ampicilina/sulbactam 200 mg/kg/iv/d (de ampicilina) fraccionadas [15], sabiendo de la disponibilidad de estos antibióticos en nuestro centro (Tabla 1), es por lo que la prescripción de Cefotaxima constituye una sobreutilización relativa. La cefixima es una cefalosporina de uso oral, por lo que no debe prescribirse en profilaxis perioperatoria [16].

4. CONCLUSIONES

La prescripción de antibióticos de amplio espectro es adecuada en general, los antibióticos prescritos y las indicaciones para las que estos se prescriben están en correspondencia con los estándares internacionales.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar conflictos de interés

REFERENCIAS

1. G.N. Sosa-Ceh, S. Moreno-Espinosa & R. Jiménez-Juárez. Evaluación del uso inapropiado de antimicrobianos en infecciones bajas respiratorias virales en el hospital infantil de México Federico Gómez. *Rev. Enferm. Infecc. Pediatr.*, **33**(135), 1820–1825 (2021). URL: <https://biblat.unam.mx/hevila/Revistadeenfermedadesinfecciosasenpediatria/2020/vol32/no135/8.pdf>
2. J. de la Flor i Brú. Infecciones de vías respiratorias alta-1: faringitis aguda y recurrente. *Pediatr. Integral*, **XXI**(6), 385–393 (2017). URL: https://pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2017/xxi06/01/n6-385-393_JosepFlor1.pdf
3. A. Montesdeoca-Melián & M. Castillo de Vera. Uso racional de antibióticos en pediatría. *Pediatr. Integral*, **XXVII**(6), 321–330 (2023). URL: https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2023/xxvii06/03/n6-321-330_AbianMontesdeoca.pdf
4. J. Hernández-Blanquel, E. Yunes-Díaz & M. Sánchez-Domínguez. Uso de antibióticos en hospital pediátrico para infección respiratoria y enfermedad diarreica. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, **61**(4), 449–456 (2023). doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8200290>
5. A. Rincón-Alarcón, J. Quispillo-Moyota, S. Cando-Punguil & V. Rodríguez-Vinueza. Abordaje de la antibioterapia prescrita en pacientes pediátricos de una unidad de salud, Tungurahua-Ecuador. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **51**(3), 1434–1447 (2022). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.102229>
6. H. Herrero-Aguirre, S. Vega-Sam, R. Legrá-Rodríguez, B. Gei-Herrero, J.A. Candel-Herrero. Cambios en la prescripción de antimicrobianos utilizados en un hospital infantil. *MEDISAN*, **19**(12), 5047 (2015) URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medisan/mds-2015/mds1512c.pdf>
7. J.C. Maldonado. Prescripción de medicamentos y problemas en el proceso terapéutico. *Rev. Med. Vozandes*, **28**, 5–8 (2017). URL: https://revistamedicavozandes.com/media/2017/RMV2017v28n1_01_2017_editorial.pdf
8. D.M. Calvo-Barbados, M. Cires-Pujol, M.A. Cruz-Barrios, M.I. Delgado, C.J.L. Domínguez, J.A. Furones, et al. *Formulario Nacional de Medicamentos*. ECIMED, La Habana, 2011.
9. L.A. Rodríguez-Sánchez. Prescripción de antibióticos en el Servicio de Pediatría del Hospital General Docente de Morón. *Mediciego: Revista Médica electrónica de Ciego de Ávila*, **26**(4), e1862 (2020). URL: <https://revmediciego.sld.cu/index.php/mediciego/article/view/1862/3665>
10. S.C. Cando-Punguil. *Análisis acerca de la prescripción de antibióticos a pacientes pediátricos, en el Hospital Básico de Pelileo provincia de Tungurahua*. Trabajo de Grado. Escuela Superior

- Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador, 2019. 60 p. URL: <http://dspace.es-poch.edu.ec/handle/123456789/11121>
11. A.R. Letourneau. Cefalosporinas. UpToDate, 2022.
 12. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum Edición 2015. URL: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/cefepima>. Consultado el 19 de julio de 2024.
 13. A. Hernanz-Lobo & J. Saavedra-Lozano. *Bases para la elección racional de un tratamiento antimicrobiano*. Guía_ABE (v.3/2018). Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico. URL: <http://www.guia-abe.es>. Consultado el 24 de julio de 2024.
 14. A.L. Graziani. Azitromicina y Claritromicina. UpToDate, 2022.
 15. Organización Panamericana de la Salud. *Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022*, 8a ed. Washington, D.C., 2019. 396 p. URL: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51695/9789275321133_spa.pdf?sequence=9&isAllowed=y
 16. H.A. Lopardo (coordinador). *Antibióticos: Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia*. Editorial de la UNLP, La Plata, Argentina, 2020. pp. 21-27. URL: <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/1531>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.M. Boizant-Crombet, L. Guibert-Basto, R.L. Mora-Poll, M. Sell-Lliveras & Y. Palay-Justiz. Prescripción de antimicrobianos en el hospital infantil sur “Antonio María Beguez Cesar”, Santiago de Cuba, Cuba, 2024. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 302–310 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.116079>

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO FARMACÉUTICAS

NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), con una periodicidad cuatrimestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas, como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos, la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al Editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, al correo electrónico rcciquifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de cuatro 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 y Resumo. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (Summary) independiente del idioma del manuscrito.
- Palabras clave (debajo del Resumen), Keywords (debajo de Summary) y Palavras-chave (debajo de Resumo). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por punto y coma y espacio. Preferiblemente tomadas del *MeSH Tools for finding Keywords* (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/authors.html>)
- 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 (Las secciones y subsecciones deben estar numeradas de forma arábiga). Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados

y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.

- Las tablas deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas.
- Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan 'figuras' y deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de las figuras.

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

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

UV $\lambda_{\max}$ (solvente ϵ) nm (log ϵ). Ej.: UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) 275 (log ϵ 2,94).

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

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

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

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

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

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

Referencias en 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. Es recomendable indicar el número doi o el link de todas las referencias.

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, año entre paréntesis, y doi. 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). Doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90303-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90303-6)

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro en letra itálica, 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: editores, título del libro en letra itálica, 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: S.W. Pelletier (editor). *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. 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 en letra itálica, 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:

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas

Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.º 45-03, Ed. 450, Of. 310

Fax: 57-1-3165060

Bogotá D. C., Colombia

Correo electrónico: rccquifa_fcbog@unal.edu.co

Dirección WEB: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa>