

Facultad de Ciencias  
Sede Bogotá

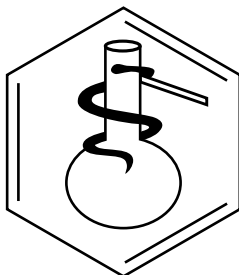


UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

Fondo gráfico que muestra un frasco de Erlenmeyer y un tubo de ensayo, ambos con un efecto de sombra o recorte que los hace parecerse a siluetas o formas que se superponen.

**REVISTA COLOMBIANA  
DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.

Correo electrónico: [rcquifja\\_febog@unal.edu.co](mailto:rcquifja_febog@unal.edu.co)

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

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

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

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

**Vicerrector sede Bogotá:** Jaime Franky Rodríguez, M. Sc.

**Decano Facultad de Ciencias:** Giovanni Garavito Cárdenas, Ph. D.

**Director Departamento de Farmacia:** Jesús Becerra Camargo, Ph. D.

**Directora Área Curricular de Farmacia:** Pilar Ester Luengas Caicedo, Ph. D.

**Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas:**

Fleming Martínez Rodríguez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, correo electrónico:

[fmartinezr@unal.edu.co](mailto:fmartinezr@unal.edu.co)

**Comité Científico:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*William E. Acree, Jr.*, Ph. D., Department of Chemistry, University of North Texas, Denton, Texas, U.S.A.

**Comité Editorial:**

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

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

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

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

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

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

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

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

**Evaluadores:**

*Arnulfo Rojas-Pérez*, Ph. D., Departamento de Química, Universidad de Puerto Rico, Humacao, Puerto Rico.

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

*Carlos A. Calderón-Ospina*, Ph. D., Unidad de Farmacología, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

*Claudia P. Ortiz*, M. Sc., Corporación Universitaria Minuto de Dios - UNIMINUTO, Neiva, Huila, Colombia.

*Cristiane F. F. Graef*, Ph. D., Department of Pharmacy, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

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

*Edgar F. Vargas*, Ph. D., Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, D. C., Colombia.

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

*Janny A. Villa-Pulgarin*, Ph. D., Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Uniremington, Medellín, Colombia.

*Luis Cibilla-Ríos*, Ph. D., Departamento de Química Orgánica, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá.

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

*Manuel García-Flórez*, Ph. D., Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

*Marzieh Razavizadeh*, Ph. D., Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran.

*Paola Villegas-Guzmán*, Ph. D., Fundación Universitaria Navarra - UNINAVARRA, Neiva, Huila, Colombia.

*Ximena Zarate*, Ph. D., Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

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

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

Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: [proceditor@yahoo.es](mailto:proceditor@yahoo.es)

**MISIÓN**

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

**VISIÓN**

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

los contenidos publicados contribuyan al desarrollo e innovación de las ciencias farmacéuticas.

**ÉTICA**

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

**LICENCIA CREATIVE COMMONS**



Todo el contenido de esta revista, excepto donde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en [http://creativecommons.org/?page\\_id=13](http://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/rcquifja>

## Contenido

Main laboratory methods used for the isolation and identification of <i>Staphylococcus spp.</i> Gustavo Fernandes Queiroga Moraes, Laísa Vilar Cordeiro, Francisco Patricio de Andrade Júnior	5
Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (neem) leaves Maisa Sayuri Nagano, Claudemir Batalini	29
Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Paulo Roberto Barros Gomes, Gilson Vitorino de Assunção, Gustavo Oliveira Everton, Helson Souza de Lima, Jorge Ricardo Fernandes de Araújo, Eduardo Fonseca Silva, Andréa Vasconcelo Melo, Hilton Costa Louzeiro, Jonas Batista Reis, Victor Elias Mouchrek Filho	48
Luliconazole: Stability-indicating LC method, structural elucidation of major degradation product by HRMS and <i>in silico</i> studies Douglas dos Santos Porto, Lisiane Bajerski, Marcelo Donadel Malesuik, Juliano Braun Azeredo, Fávero Reisdorfer Paula, Clésio Soldateli Paim	61
Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym. -Hamet & H. Perrier Margarita Báez, Esther Inés Torres, Ana Elena Gruszycki, Daniel Andrés Alba, Gabriela Malena Valenzuela, Mabel Rosalía Gruszycki	86
Explorando os estresses oxidativo e nitrosativo contra fungos: um mecanismo subjacente à ação de tradicionais antifúngicos e um potencial novo alvo terapêutico na busca por indutores oriundos de fontes naturais Cláudio Daniel Cerdeira, Matheus Pereira de Araújo, Carla Beneditini Ribeiro, Jorge Ferreira, Amanda Latercia Tranches Dias, Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão	100
Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico Patrícia de Oliveira Centurião, Patrícia Espinosa dos Santos, Aline Marques Rosa, Nájla Mohamad Kassab	158
A descrição matemática da detecção eletroquímica da ergina, assistida pelos novos derivados triazólicos, dopados pelo íon amavadiná Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Volodymyr V. Parchenko, Vira M. Odyntsova, Ilona I. Aksyonova, Yana G. Ivanushko, Petro I. Yagodynets', Zholt O. Kormosh	174

- Estudio descriptivo transversal de los grupos terapéuticos más prescritos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México  
Veronica Castro Bear, Francisco L. Balderas Gómez, Oscar Zuñiga Lemus 184
- Descripción matemática de la determinación electroanalítica del fármaco salvarsano y su ciclooligómeros, asistida por un compuesto del colorante escuárico y oxihidróxido de cobalto  
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. De Oliveira, Lucinda Vaz dos Reis, Petro I. Yagodynets'1, Zholt O. Kormosh 205
- Hydrazones derived from natural aldehydes: *in vitro* cytotoxic evaluation and *in silico* pharmacokinetic predictions  
Viktória Laysna dos Anjos Santos, Arlan de Assis Gonsalves, Maria Franciele Souza Silva, Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira, Marcília Pinheiro da Costa, Claudia O. Pessoa, Cleônia R. M. Araújo 217
- Actividad antioxidante de cuatro especies vegetales del nordeste argentino  
Ariadna Soledad Soro, Gabriela Malena Valenzuela, María Beatriz Núñez 236
- Caracterização físico-química, fitoquímica e avaliação da eficácia antimicrobiana de um gargarejo fitoterápico  
Laura Christina Freitas, Ana Laura de Cabral Sobreira, Francisco Patricio de Andrade Júnior, Egberto Santos Carmo, Júlia Beatriz Pereira de Souza 253
- Food nitrates and nitrites as possible causes of cancer: A review  
Francisco Patricio de Andrade Júnior, Ana Laura Sobreira de Cabral, Januse Millia Dantas de Araújo, Laísa Vilar Cordeiro, Marília de Barros Cândido, Alison Pontes da Silva, Brenda Tamires de Medeiros Lima, Bruna Braga Dantas 269
- Prediction of sulfamerazine and sulfamethazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models  
Luz Elena Tinoco, Diana M. Galindres, Jhonny Osorio, Rossember E. Cárdenas 292

## Main laboratory methods used for the isolation and identification of *Staphylococcus* spp.

Gustavo Fernandes Queiroga Moraes<sup>1</sup>, Laísa Vilar Cordeiro<sup>2</sup>, Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: gustavoo.queiroga@gmail.com.

<sup>2</sup>PhD in Post-Graduate Program on Natural and Bioactive Synthetic Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: laisavilar@gmail.com.

<sup>3</sup>Master of Post-Graduate Program on Natural and Bioactive Synthetic Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com.

Received: 6 August 2020

Revised: 28 September 2020

Accepted: 30 September 2020

### SUMMARY

**Introduction:** Laboratory diagnosis related to clinical microbiology is highly complex, due to subjectivity when interpreting the results. Among bacterial pathogens, those linked to the *Staphylococcus* genus are relevant from a clinical and epidemiological point of view. **Aim:** To review the literature relative to the main laboratory methods used for the isolation and identification of microorganisms of the genus *Staphylococcus*. **Methodology:** The study was based on a literature search between 2000 and 2020, in the BVS, PubMed, Scielo, ScienceDirect and CAPES Periodical databases. Regarding its laboratory diagnosis, microscopy is used by the Gram method to verify the bacterium's morphology; novobiocin test, aiming to trace coagulase negative strains; use of biochemical tests, such as coagulase and catalase tests; identification through the use of selective and nonspecific culture media, such as blood agar (in which the hemolytic patterns of pathogens are observed), salty mannitol agar (specific to the species of *Staphylococcus aureus*) and DNase agar (selective to *S. aureus* strains, *S. intermedius* and *S. hyicus*). **Results:** The *Staphylococcus* genus is of great clinical importance in the field of public health. Thus, the quality and speed of diagnosis are essential to promote measures to combat these pathogens, contributing to the well-being and survival of those affected.

**Keywords:** Microbiology, *Staphylococcus*, clinical laboratory techniques.

## RESUMEN

### Principales métodos de laboratorio utilizados para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus* spp.

**Introducción:** el diagnóstico de laboratorio relacionado con la microbiología clínica es muy complejo, debido a la subjetividad al interpretar los resultados. Entre los patógenos bacterianos, los relacionados con el género *Staphylococcus* son relevantes desde un punto de vista clínico y epidemiológico. **Objetivo:** revisar la literatura relacionada con los principales métodos de laboratorio utilizados para el aislamiento e identificación de microorganismos del género *Staphylococcus*. **Metodología:** el estudio se basó en una búsqueda bibliográfica entre 2000 y 2020, en las bases de datos BVS, PubMed, Scielo, ScienceDirect y Periódicos CAPES. En cuanto a su diagnóstico de laboratorio, se utilizan la microscopía y el método de Gram para verificar la morfología de la bacteria; prueba de novobiocina, con el objetivo de rastrear cepas negativas de coagulasa; uso de pruebas bioquímicas, como las pruebas de coagulasa y catalasa; identificación mediante el uso de medios de cultivo selectivos e inespecíficos, como agar sangre (en el que se observan los patrones hemolíticos de los patógenos), agar manitol salado (específico para la especie de *Staphylococcus aureus*) y agar ADNse (selectivo para cepas de *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hyicus*). **Resultados:** el género *Staphylococcus* es de gran importancia clínica en el campo de la salud pública. Por lo tanto, la calidad y la velocidad del diagnóstico son esenciales para promover medidas para combatir estos patógenos, contribuyendo al bienestar y la supervivencia de los afectados.

*Palabras clave:* Microbiología, *Staphylococcus*, técnicas de laboratorio clínico.

## RESUMO

### Principais métodos laboratoriais utilizados para o isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

**Introdução:** o diagnóstico laboratorial relacionado à microbiologia clínica é de elevada complexidade, em virtude da subjetividade perante na interpretação dos resultados. Dentre os patógenos bacterianos, os vinculados ao gênero *Staphylococcus* são relevantes desde o ponto de vista clínico e epidemiológico. **Objetivo:** fazer uma revisão narrativa sobre os principais métodos laboratoriais utilizados para o isolamento e identificação de microrganismos do gênero *Staphylococcus*. **Metodologia:**

o estudo baseou-se em uma pesquisa na literatura entre o período de 2000 a 2020, nas bases de dados BVS, PubMed, Scielo, ScienceDirect e Periódico CAPES. Quanto ao seu diagnóstico laboratorial utiliza-se a microscopia, através do método de Gram, para verificação da morfologia da bactéria; teste da novobiocina, objetivando o rastreamento de cepas coagulase negativa; uso de provas bioquímicas, como os testes de coagulase e catalase; identificação por meio da utilização de meios de cultura seletivos e inespecíficos, como o agar sangue (em que se observa os padrões hemolíticos dos patógenos), agar manitol salgado (específico a espécie de *Staphylococcus aureus*) e agar ADNse (seletivo as estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*). **Resultados:** o gênero *Staphylococcus* é de grande importância clínica no âmbito da saúde pública. Assim, a qualidade e rapidez do diagnóstico são imprescindíveis para promover medidas de combate a esses patógenos, contribuindo para o bem-estar e sobrevida dos acometidos.

*Palavras-chave:* Microbiologia, *Staphylococcus*, técnicas de laboratório clínico.

## INTRODUCTION

Laboratory diagnosis related to clinical microbiology is highly complex, due to subjectivity when the results are interpreted. Even with the development of more modern and specific methods, through the incorporation of genomics and proteomics in microbiology and laboratory automation, the interpretation of the results is still linked to the quality of the samples for analysis. Therefore, the data need to be accurate and clinically relevant, which is why laboratories request that any microbiological samples be correctly chosen, collected and transported in order to improve their analysis and interpretation [1].

Initially, the procedure that must be performed for a microbiological diagnosis is the collection of biological material, followed by transport and analysis in the laboratory, which can be done through the use of dyeing methods, biochemical tests, and culture media.

It is recommended by health organizations that the isolation of the microorganism occurs from samples collected in the body region where the infection is occurring, since in this place there is a greater concentration of microorganisms that are causing the infectious process [2]. It is also important to emphasize the need to perform antisepsis of the site before collection and to use sterile instruments in the procedure, in order to reduce contamination by other microorganisms. In addition, it should always be recommended that the collection be performed in the most acute phase of the disease, as it is likely that the patient is not yet using antimicrobial drugs.

The isolation of bacteria allows the responsible professional to observe characteristics using microscopy and dyeing methods. Culture, in turn, provides an analysis of the sensitivity of pathogens to chemotherapeutic drugs, in addition to contributing to differentiation between genera and species (selective and differential means). In relation to gene sequencing tests and proteomic studies, it is necessary to obtain a pure culture, which makes it possible to verify the invasive potential of the pathogen, mechanisms of virulence and resistance to antibacterial drugs [3].

When compared to clinical diagnosis, laboratory testing is preferable, since the signs and symptoms seen in illnesses are generally inconclusive and similar to other diseases. In addition, early diagnosis, in the case of bacterial infections, is essential, enabling the faster initiation of recommended therapies, avoiding possible complications to the patient [4].

Among bacterial pathogens, those linked to the *Staphylococcus* genus are relevant from a clinical and epidemiological point of view. They belong to the Micrococcaceae family, which can be classified as Gram-positive, immobile, non-spore producing cocci, positive catalase and facultative anaerobes. These microorganisms are part of the normal microbiota of healthy individuals, thus being located on the skin and mucous membranes, however they can also be found in food, sewage, air and feces. They present several forms that vary from isolated, in pairs, in short chain and grouped in an irregular way. They are considered mesophilic agents with growth between 7-47.8 °C and can synthesize heat-resistant enterotoxins. In addition, these microorganisms proliferate in media consisting of relative concentrations up to 15% sodium chloride (NaCl) [5-7].

*Staphylococcus* spp. they can be divided into two groups: those with positive coagulase, which is comprised of four species (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hycuse* and *S. delphinie*) and those with negative coagulase, corresponding to more than ten species. Both groups are of clinical interest because they cause food poisoning and healthcare-related infections [8-11].

Among the species included in the genus, *Staphylococcus aureus* is the most clinically important, its incidence varies between 10 to 30 cases per 100 000 people per year, in which the most affected ages are at the extremes of life (children and the elderly), being the black population was shown to be prevalent [12, 13].

Due to the negative impact on public health caused by microorganisms present in the genus *Staphylococcus*, it is necessary to carry out an effective, quality, and rapid diagnosis, aiming at an appropriate treatment and cure of the patient. However, there is little scientific literature on this subject. In view of this, the purpose of this study is to



conduct a narrative review on the main laboratory methods used for the isolation and identification of microorganisms of the genus *Staphylococcus*.

## MATERIALS AND METHODS

This research is a review of literature of the narrative type, in which there was a search for articles, books, dissertations and theses in the databases: BVS (Regional Health Portal), PubMed, SciELO, ScienceDirect and Periodical CAPES, with the following associated descriptors: *Staphylococcus* AND diagnóstico, *Staphylococcus* AND diagnóstico laboratorial, *Staphylococcus* AND microscopia, *Staphylococcus* AND coloração de Gram, *Staphylococcus* AND teste da catalase, *Staphylococcus* AND teste da coagulase, *Staphylococcus* AND meios de cultura, *Staphylococcus* AND agar sangue, *Staphylococcus* AND agar manitol salgado, *Staphylococcus* AND agar DNase, *Staphylococcus* AND teste da novobiocina, MRSA AND diagnóstico, VISA AND diagnóstico, VRSA AND diagnóstico, *Staphylococcus* AND diagnosis, *Staphylococcus* AND laboratory diagnosis, *Staphylococcus* AND microscopy, *Staphylococcus* AND Gram coloring, *Staphylococcus* AND catalase test, *Staphylococcus* AND coagulase test, *Staphylococcus* AND culture media, *Staphylococcus* AND blood agar, *Staphylococcus* AND mannitol salt agar, *Staphylococcus* AND DNase agar, *Staphylococcus* AND novobiocin test, MRSA AND diagnosis, VISA AND diagnosis, VRSA AND diagnosis.

Articles published between 2000 and 2020 were included, prioritizing the most recent publications that addressed the proposed theme which presented information on concepts and diagnosis of the *Staphylococcus* genus and that were published in English or Portuguese. Studies that did not deal with diagnoses of the *Staphylococcus* genus, which brought information about other bacterial genera or that were not available in full, they were excluded.

## LITERATURE REVISION

*Staphylococcus* are responsible for the appearance of several types of diseases, however they have been associated, mainly with skin infections such as impetigo, folliculitis, boils, carbuncles and in some situations they can even gain blood flow causing septicemia [12].

The collection of purulent materials must be performed after previous cleaning of the lesion, wound or abscess margins using a solution of aqueous Povidone-iodine (PVP-I) and saline solution (half/half). Then, the actual collection is done by aspirating with a syringe and needle, in order to collect the purulent material present in the innermost region of the wound avoiding contamination, or through swabs. Finally, the material is

transported to the laboratory, in which the use of means of transport such as Amies or Stuart is recommended, contributing to the preservation of the sample and viability of the microorganism [14].

## Microscopy

Microscopy plays an important role in the biological and medical sciences, contributing to great progress in understanding the systems of living beings and diseases. Such advances are provided due to their property related to optical resolution, since it makes it possible to determine structures with very small sizes. Improvements in this area aim at increasing the optical resolution and, consequently, the quality of the images viewed through the microscope [15].

In microbiology, this method allows the health professional to describe the morphology of the pathogen, measure the number of microorganisms present per field of view and determine the type of motility of the bacteria [16]. In some circumstances it is essential to perform staining techniques, to visualize the shape and bacterial arrangement. As an example, for *Staphylococcus* spp., Gram stain is used, in which the presence of coconuts that can be joined together is observed, resembling *grape bunches* [12].

### *Gram stain*

Gram staining comprises the tintorial method of greatest use and relevance in microbiology, which aims to classify pathogens by their size, shape, cell structure and color. Based on this methodology, bacteria can be organized into two groups: Gram-positive and Gram-negative. Gram-positives are colored purple and Gram-negatives are colored red [17, 18].

The dyes used are violet crystal (VC) and safranin. VC is a cationic dye belonging to the chemical group of triphenylmethanes, which is sold in concentrations between 1-2%, being responsible for attributing the characteristic color to Gram-positive organisms. Safranin, on the other hand, is a cationic dye that makes it part of the group of triarylpyrazines. It has a color spectrum distinct from the VC, giving Gram-negative pigmentation to its particular pigmentation. In addition, both are hydrophilic [19-22].

At first, a smear is prepared with the bacterial strain on the slide intended for microscopy, in which the smear is fixed using heat or some chemical method. Then, the VC is dripped on the slide, allowing it to react for 1 min. Right after, washing with running water is carried out to remove the excess of VC and then the lugol is added for 1 min which will have the function of allowing the fixation of the primary dye, followed by washing.

Afterwards, a bleach called alcohol-acetone is used for 10 seconds which is removed with water after the stipulated time. Gram-positive bacteria have the ability to retain VC, because their cell wall is quite thick with peptidoglycan, which forms a mesh. This mesh when suffering the action of alcohol-acetone and dehydrates, consequently, the network is blocked, preventing the dye from leaving the wall. Gram-negatives, in turn, have a cell wall with a thin layer of peptidoglycan, so their water loss will not be enough to provide the mesh closure, so the dye is not retained. In addition, Gram-negative microorganisms have an external cell membrane rich in lipids, in which upon contact with the organic solvent, they are solubilized, resulting in the elimination of adhered VC. Thus, Gram-positive stains purple due to the VC whereas Gram-negative ones are transparent, since the VC will not be retained in this type of bacteria due to the bleach and its small amount of peptidoglycans.

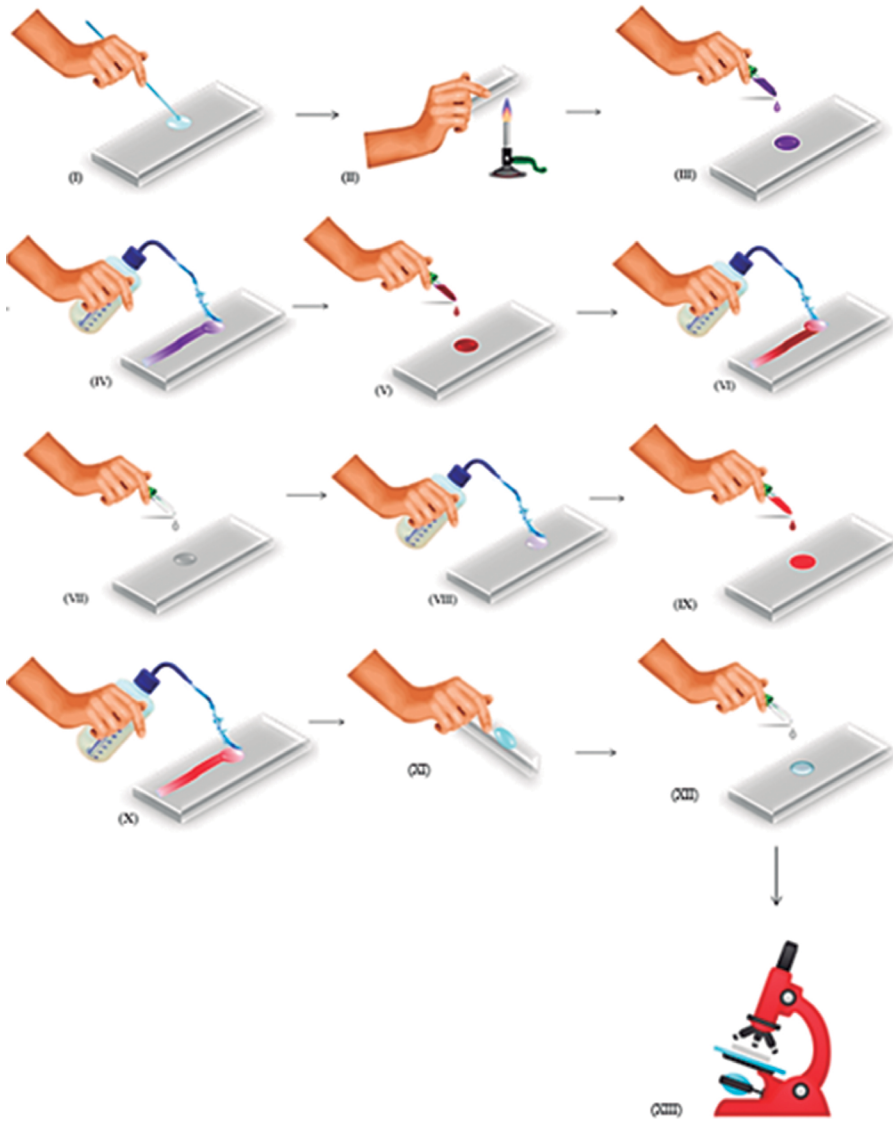
Finally, the safranin is dripped, allowing it to react for 1 min, followed by washing. Then, the slanted slide is placed to remove excess dye and allow drying. Thus, as the Gram-negatives were without the presence of dye they will be able to retain the safranin, staining red or pink, while the Gram-positives as they already had the VC used in their structures, will not have the ability to retain another type coloring agent, remaining purple. In addition, the slide is analyzed with immersion oil in the optical microscope in the 100x objective [19, 23]. This methodology can be seen in figure 1. Therefore, microbes belonging to the *Staphylococcus* genus are classified as Gram-positive cocci, so they are stained purple [24].

## **Bacterial identification tests**

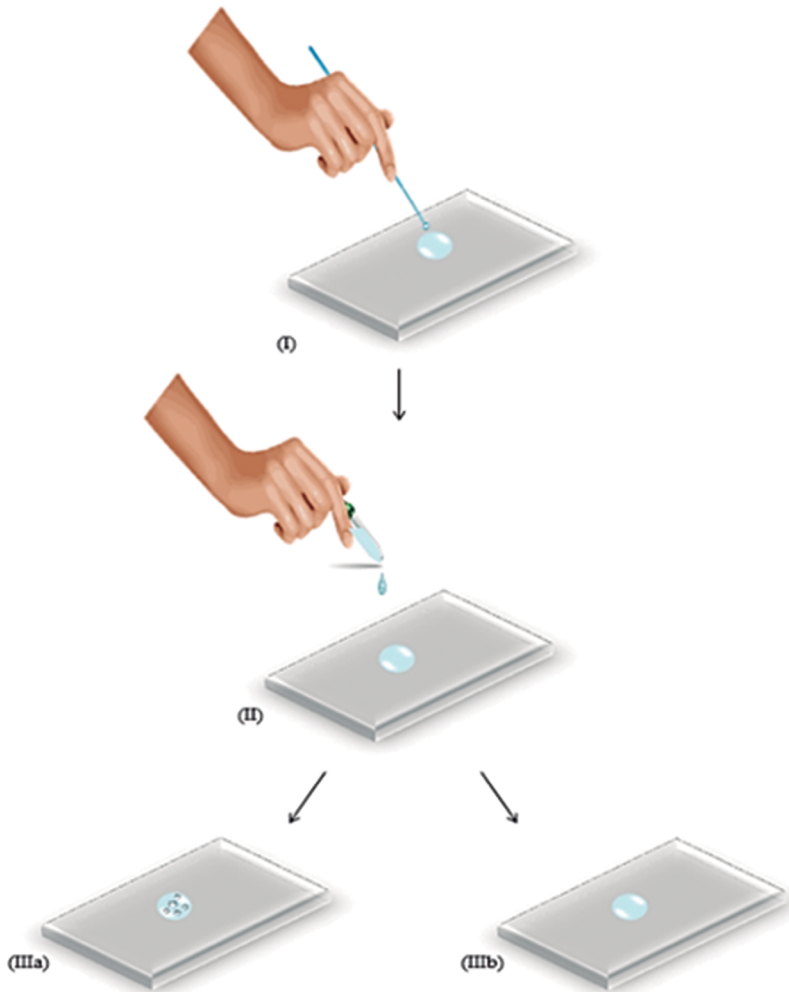
### *Catalase test*

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is a reactive oxygen species synthesized by human metabolism and which is indispensable for the leukocyte's antimicrobial activity. However, some bacteria produce an enzyme called catalase that works as a way of protecting the microbe against this mode of action of the immune system, as it will promote the degradation of  $H_2O_2$  in water ( $H_2O$ ) and oxygen ( $O_2$ ) [25].

The catalase test consists of a qualitative method for identifying this enzyme in the bacterial species analyzed, aiming at distinguishing between the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus*, since among these genera only *Staphylococcus* will be able to produce it. From a smear of the strain on a glass slide, a drop of 3%  $H_2O_2$  is dripped, and subsequently, the formation or not of bubbles originating in the microbial colony is verified [26]. Such methodology can be seen in figure 2.



**Figure 1.** Gram staining steps. (I) Preparation of the bacterial smear. (II) Smear fixed through the heat emitted by the flame of the Busen burner. (III) Dripping the CV until it covers the entire smear, leaving it to rest for 1 min. (IV) Blade washing. (V) Drip from the lugol until it covers the entire smear, leaving it to rest for 1 min. (VI) Blade washing. (VII) Dripping of the bleach until it covers the entire smear, leaving it to rest for 10 seconds or less. (VIII) Blade washing. (IX) Dripping the safranin until it covers the entire smear, leaving it to rest for 1 min. (X) Blade washing. (XI) Inclination of the blade. (XII) Dripping immersion oil on the slide. (XIII) Observation of the slide under the microscope.



**Figure 2.** Test steps to identify the catalase enzyme. (I) Smear of the bacterial strain. (II) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dripping. (IIIa) Blistering in the bacterial smear. (IIIb) There was no bubble formation in the bacterial smear.

In the test, the visible bubbling of the smear is triggered by the release of O<sub>2</sub> (product of the reaction) to the environment, indicating that the pathogen possessed the ability to produce the enzyme, being thus classified as catalase-positive. However, if bubbles do not occur, the bacterium is considered catalase-negative [27]. Thus, the genus *Staphylococcus* is categorized as catalase-positive and *Streptococcus* spp. it is classified as catalase-negative [28, 29].

### *Coagulase test*

Coagulase is an extracellular enzyme synthesized by some species of *Staphylococcus*, which is considered a virulence factor of the microorganism. In contact with blood plasma, this protein acts by reacting prothrombin, creating a complex that will be responsible for providing the conversion of fibrinogen into fibrin, coagulating the plasma [30].

The coagulase identification method allows the recognition of species of the genus *Staphylococcus* spp. In addition, this test is characterized by being fast and inexpensive, due to its speed in making and using few materials [31].

This test consists of inoculating a suspension of the bacterial strain in rabbit plasma in a test tube, which will be incubated in a bacteriological incubator at 37 °C, for 24 h. Over this time period, it will be observed whether or not there is the formation of a clot in the plasma, in which the presence of coagulation will indicate a positive result and the opposite, negative [32, 33]. Such methodology is represented in figure 3.

Another way of carrying out the coagulase test, occurs through the use of a slide in which the blood plasma of the rabbit drips into the microbiological suspension, which are observed to form or not the clot in a short period of time. However, the realization of the methodology using the test tube is more sensitive and reliable [34].

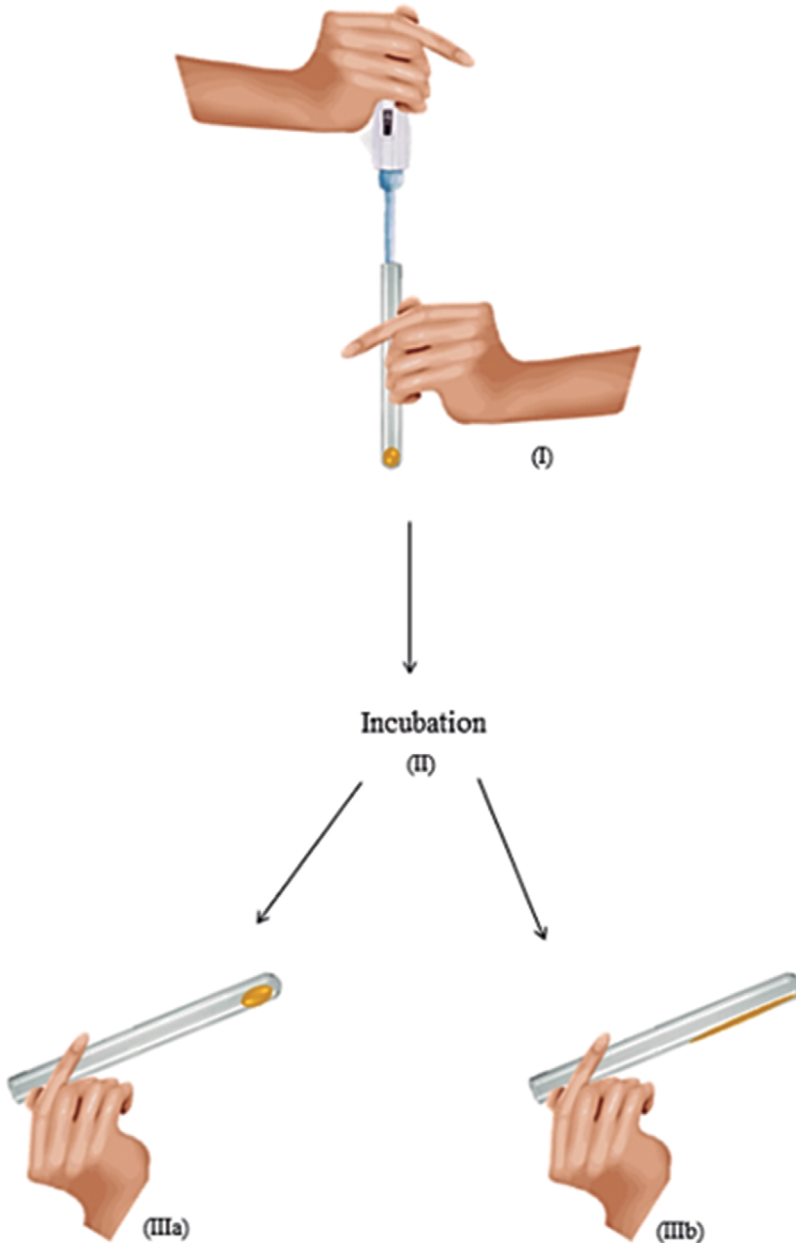
Thus, the strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus hyicus* are coagulase-positive, however, the other species of the genus are classified as negative coagulase, which can be highlighted, because of their clinical importance, since they affect most frequently immunodeficient patients, the following microorganisms: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus carnosus* [35, 36].

### **Culture media**

The culture media are used to identify microorganisms, with a view to promoting an environment conducive to the multiplication and survival of bacteria and fungi, due to supplying their needs to essential substances such as carbon, nitrogen, minerals, water, factors of growth and vitamins [37].

### *Blood agar*

Blood agar consists of a culture medium widely used in clinical microbiology laboratories, being easy to prepare and low cost [38]. This culture medium consists of 5% blood from some mammal, usually that of the sheep. In addition, it allows the identification



**Figure 3.** Stages of the coagulase test. (I) Rabbit plasma is added to the bacterial suspension. (II) Incubation of the material in a bacteriological incubator. (IIIa) There was formation of the clot. (IIIb) There was no clot formation.

and isolation of several bacteria, therefore they are nonspecific, however, the distinction of species and genera is possible, according to the hemolytic standards of each strain [39].

In this sense, colonies of the genus *Staphylococcus* on blood agar, are checked with a white or yellow tint, creamy, opaque, and convex. Some species, such as *Staphylococcus aureus*, form a transparent halo close to the places found in the culture medium, as they are capable of providing a  $\beta$ -hemolysis (total hemolysis) [40, 41]. However, the difference in hemolytic patterns cannot be used as the sole diagnostic criterion, and there must be the use of staining methods, biochemical tests, and selective means to contribute to the correct identification of any and all microorganisms.

#### *Salted Mannitol Agar*

Salted mannitol agar is a selective culture medium, that is, specific to certain bacteria, since it is composed of 7.5% sodium chloride (NaCl) and, therefore, selects pathogens that have the ability to survive high concentrations of salt. In addition, it also contains a glycode (mannose) and a pH indicator called phenol red. Microbial growth occurs through the fermentation of this sugar, which will promote a change in the pH of the culture medium, chemical changes in the indicator and a consequent change in color from red to yellow. Thus, strains of *Staphylococcus aureus* (since they have the ability to ferment mannose and survive high concentrations of NaCl) will form yellow colonies, however the other species of the genus (salt tolerant) will result in reduced pink or red colonies, representing an absence of change in shade of salty mannitol agar [42-44].

#### *DNase agar*

DNase agar is composed of deoxyribonucleic acid (DNA), which will serve as a substrate for deoxyribonuclease enzymes (DNase) that can be produced by some microorganisms. DNase will act by depolymerizing the DNA, resulting in the formation of a transparent halo in the culture medium that can be visualized around the colonies. Strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*, are considered DNase positive. In the other species of the genus there is no halo formation, therefore they are negative to the test [45-48].

As an alternative method, 0.1% orthotoluidine blue dye can be added or purchased included in the DNA agar. This addition to the medium has the advantage of providing a more comprehensive reading, due to its ease when viewing the exam, as positive samples will pigment with pink around the enzyme-producing colonies [49].



### *Novobiocin test*

Novobiocin, derived from coumarins, is an antibacterial drug used in humans for the treatment of infections caused by Gram-positive bacteria. This drug acts on the topoisomerase B subunits of microorganisms, called gyrase B, affecting the unfolding of DNA, and preventing its replication [50, 51].

The novobiocin test aims to screen for negative coagulase strains, by performing the raising in Petri dishes filled with Agar Müller Hinton medium, plus a novobiocin disc containing 5 µg. The resistant strains will present an inhibition zone between 6-12 mm, on the other hand, sensitive species will present values greater than 16 mm [52].

Thus, all strains of *Staphylococcus saprophyticus* are resistant to novobiocin. The rest of the species comprising the genus, usually in the laboratory routine, are sensitive to the active substance [53].

### **Techniques used to assess microbial resistance**

#### *Broth dilution*

Broth dilution is a method applied to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which is the lowest concentration necessary to inhibit the visible growth of bacteria and fungi.

In this technique, there is an analysis of the relationship between the growth of the microorganism in the broth and the concentration of the test drug, in which the growth of the bacterium or fungus is observed by turbidity of the liquid medium. This assay enables quantitative results to the clinical analyst and no interferences promoted by the microbe's development kinetics are observed. As a sterility control, culture broth without substances or inoculum is used in parallel to the test. As for the viability control, culture broth and inoculum are used, without test substances [54]. In addition, dilution in broth can be done by means of macrodilution or microdilution.

The macrodilution corresponds to the experiment that is performed using test tubes, in which there may be variations from 1 to 10 mL in the volume of the culture medium and test substance. However, there are some disadvantages: more waste, requires more space to couple the tubes and has a limited number of replicas [54, 55]. In microdilution, in turn, microplates consisting of 96 wells are used. In each well, 100 µL of the most appropriate liquid culture medium is added and, immediately after, a serial dilution of 2 is performed with the tested drug, allowing the obtaining of different concentrations of the tested drug. In this methodology, several advantages are evidenced,

among them, the use of small amounts of culture medium and drugs, good precision, and sensitivity, however it is not so exact [7, 56].

#### *Agar dilution*

Agar dilution is a test characterized by the insertion of the analyzed substances in different concentrations in a solid culture medium. The solutions are deposited in individual Petri dishes, where each dish corresponds to a single concentration of the drug. Thus, the bacterial strains are introduced to the surface of the culture medium with the aid of a multi-inoculator, in which they distribute from 1 to 3  $\mu\text{L}$  of the inoculum [57].

#### *Etest®*

The Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden) corresponds to a commercially acquired plastic tape, through which it is soaked in increasing concentrations of an antimicrobial. To perform the test, the microorganism is seeded on the surface of a solid culture medium. After 15 min, the tapes are distributed in a solid medium. After the incubation period, the MIC is determined visually. This method is quite advantageous in the routine of a clinical analysis laboratory, since it is versatile and has a good consonance with gold standard methodologies, however it has high cost which limits the use [58-60].

#### *Disk diffusion (Kirby-Bauer)*

The disk diffusion method is simple, reliable, practical, and inexpensive. This test consists of the dissemination of the drug contained in a filter paper disc in a solid culture medium. As a result, it will promote the formation of a transparent inhibition halo, indicating the non-growth of the bacterial colony, whose size is inversely proportional to MIC and millimeters (mm) is used as the unit of measurement [55, 61].

However, in this laboratory procedure some disadvantages are evidenced, such as the complexity existing in the interpretation of the diagnosis of anaerobic microorganisms, the need for nutritional supplementation of the culture media and the presence of complications related to the analysis of the sensitivity profiles to antimicrobial drugs that are not distributed correctly on the agar [61].

#### *Automated methods*

The automated methods use three types of equipment, commercially available, to carry out antimicrobial sensitivity tests, which are VITEK GPI (bioMérieux®), Phoenix™ (BD Biosciences) and Microscan® (Dade Behring). These systems make it possible to perform susceptibility tests more quickly, being able to perform Gram identification and evaluate the sensitivity or resistance of each antimicrobial, thus being semi-quantitative. However, they are expensive, do not allow an MIC to be so accurate (with the

exception of Phoenix™, because it has the ability to perform serial dilution) and cannot perform the identification of VRSA strains [58].

### **Drugs used to determine *Staphylococcus aureus* resistance**

#### *Methicillin sensitivity test*

Methicillin corresponds to a synthetic antimicrobial drug, belonging to the family of  $\beta$ -lactams. In clinical practice, this substance was commonly used in the therapy of infections caused by *Staphylococcus aureus*, which acts by adhering to penicillin-binding proteins (PBP's), making it impossible to synthesize the bacterium's cell wall and, consequently, allowing the lysis of the microorganism [62].

The methicillin sensitivity test aims to screen methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). Regarding its performance, several tests can be used, among them, the MIC determinations (Etest®, macrodilution or microdilution) and disk diffusion stand out. In addition, latex agglutination, chromogenic agar, automated methods, rapid screening methods and molecular approaches can be performed [58].

The mechanism of resistance to methicillin results from the coding of new genes, *mecA* or *mecC*, in which they are integrated with a mobile genetic element, the *mec* staphylococcal chromosome cassette (SCC*mec*), which can be identified in MRSA isolates. In addition, resistance is also checked, most drugs included in the  $\beta$ -lactam class [63].

Infections caused by MRSA strains are classified as emergent, due to the difficulties present in diagnosis and therapy, aimed at decreasing the rates of morbidity and mortality, thus being quite common in hospitals [64].

As for its epidemiology, it is constantly changing, which its resistance profiles and clones vary between countries and regions. Patients at higher risk for infection, in turn, are equivalent to the immunosuppressed, patients with chronic diseases, patients who use catheters, individuals exposed to people with this bacterium, the elderly and those with a history of prolonged hospitalizations [65].

#### *Vancomycin sensitivity test*

Vancomycin is an antibacterial drug that belongs to the pharmacological class of glycopeptides, which is recommended and used in therapies of resistant Gram-positive cocci. This drug acts on the cell wall of these bacteria preventing the synthesis of peptidoglycan [66, 67].

The mechanism of resistance to vancomycin is related to the displacement of a plasmid constituted by the transposon of the *vanA* gene, Tn1546, resulting from vancomycin-resistant

*Enterococcus faecalis*, in which it was integrated with the plasmid of the MRSA strain. The residual part of the enterococcal plasmid has been lost, while the staphylococcal region has the potential to be expressed and transmitted to other strains [68].

The vancomycin sensitivity test aims to screen strains of resistant *Staphylococcus aureus* or of lower sensitivity to vancomycin, in which depending on the degree of resistance, they are called Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) [69].

When compared to VRSA strains, VISA strains are more prevalent, due to a lower number of microorganisms with reduced sensitivity and a variety of methodologies for their identification. Therefore, its prevalence changes according to the analyzed population, geographic region and hospitals [70].

Currently, the gold standard methodology used to identify these microorganisms is associated with tests that allow the determination of MIC. However, not all methods can be used, therefore, for VISA strains, a screening test, Etest<sup>®</sup>, dilution in broth and in agar are used. On the other hand, for VRSA strains the diffusion method and the same assays mentioned are used for the strains of VISA [58].

To perform the screening test, the suspected microorganism is inoculated into plates containing brain and heart infusion agar (BHI) with vancomycin 6 mg / mL, in addition to 10  $\mu$ L of a standardized bacterial suspension from the 0.5 McFarland scale. Then, they are incubated for 24 h in a bacteriological oven, which at the end, the formation of bacterial colonies is verified, so the growth of more than one would represent a positive result and, therefore, resistance [55].

Table 1 shows the MIC and diameters of inhibition halos related to the sensitivity profile of *Staphylococcus aureus*, to the drugs methicillin and vancomycin.

**Table 1.** *Staphylococcus aureus* sensitivity profile to the drugs methicillin and vancomycin.

Drug	Microorganism	Inhibition halo diameter ( $\pm$ mm)			MIC ( $\mu$ g/mL)		
		S	I	R	S	I	R
Methicillin	<i>S. aureus</i>	$\geq 14$	10-13	$\leq 9$	$\leq 8$	-	$\geq 16$
Vancomycin	<i>S. aureus</i>	-	-	-	$\leq 2$	4-8	$\geq 16$

Source: Adapted from Zurita *et al.* [58].

The *Staphylococcus aureus* drug resistance reflects negatively on the infected patient, since it hinders pharmacotherapy and contributes to a poor prognosis. Therefore, a fast and safe diagnosis allows a more rational pharmacological treatment and a greater probability of favorable clinical outcomes.

## CONCLUSIONS

The *Staphylococcus* genus comprises pathogens of great clinical importance in the field of public health. Thus, the quality and speed of diagnosis are essential to promote measures to combat these pathogens, contributing to the well-being and survival of those affected.

Its species are characterized by being Gram-positive and catalase positive. Regarding the coagulase test, species of this genus can be divided into two groups: positive coagulase and negative coagulase. Regarding the culture media used to identify the strains, salted mannitol agar and DNase, are selective means, generally used in the laboratory routine to identify *Staphylococcus aureus*. Blood agar, in turn, is a means used for the growth of any bacterial colonies, which also allows the identification of hemolysis patterns. As for the novobiocin test, it is applied in the screening of *Staphylococcus saprophyticus*, as it is the only one of the genus resistant to this drug.

In addition, MRSA and VRSA strains are characterized by having MIC equivalent to values greater than or equal to 16 µg/mL. VISA, in turn, has MIC between 4-8 µg/mL. Regarding the MRSA strain, more specifically, the diameter of the inhibition zone is less than or equal to 9 mm.

Since the microbiological diagnosis can be pointed out as a present difficulty among health professionals, this research may serve to improve these professionals and to encourage other research that has similar focuses.

## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## REFERENCES

1. J. M. Miller, M.J. Binnicker, S. Campbell, K.C. Carroll, K.C. Chapin, P.H. Gilligan, *et al.*, A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of

- infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology, *Clin. Infect. Dis.*, **67**(6), e1-e94 (2018).
2. R.E.P. Pereira, G.G Petrechen, Principais métodos diagnósticos bacterianos, revisão de literatura, *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.*, **16**, 12 (2011).
  3. J.-C. Lagier, S. Edouard, I. Pagnier, O. Mediannikov, M. Drancourt, D. Raoult, Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology, *Clin. Microbiol. Rev.*, **28**(1), 208-236 (2015).
  4. G.P. Alencar, J. Sabino, J.L. Gonçalves, M.R. Chang, Bacterial, fungal and viral infections in surgical site: clinical, diagnostic and epidemiological aspects, *J. Health Sci.*, **21**(3), 219-224 (2019).
  5. A.L. Santos, D.O. Santos, C.C. Freitas, B.L.A. Ferreira, I.F. Afonso, C.R. Rodrigues, *et al.*, *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **43**, 413-423 (2007).
  6. F.P. Andrade Júnior, B.T.M. Lima, T.W.B. Alves, M.E.S. Menezes, Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, **18**(1), 89-93 (2019).
  7. L. Cordeiro, P. Figueiredo, H. Souza, A. Sousa, F. Andrade-Júnior, D. Medeiros, *et al.*, Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, (2020).
  8. R.R.P. Prado, E.A. Freitas, E.C. Valadares Júnior, P.C. Costa, M.C. Siqueira, D.A. Rossi, *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública, *Pubvet*, **9**(8), 348-399 (2015).
  9. L.L.S. Rosa, L.F.M. Galvão, H. Diniz Neto, J.R. Nóbrega, D.F. Silva, F.P. Andrade Júnior, *et al.*, Isoeugenol efficacy against *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Dev. Res.*, **9**(10), 30877-30879 (2019).
  10. L. Cordeiro, P. Figueiredo, H. Souza, A. Sousa, F. Andrade-Júnior, J. Barbosa-Filho, *et al.*, Antibacterial and antibiofilm activity of myrtenol against *Staphylococcus aureus*, *Pharmaceuticals*, **13**, 133 (2020).
  11. M.H.P. Lira, F. P. Andrade Júnior, G.F.Q. Moraes, G.S. Macena, F.O. Pereira, I.O. Lima, Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review, *J. Essent. Oil Res.*, **32**, 187-197 (2020).

12. S.Y.C. Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger, T.L. Holland, V.G. Fowler Jr, *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clin. Microbiol. Rev.*, **28**(3), 603-661 (2015).
13. S.L.O. Toledo, R.M.S. Silva, I.C.R. Santos, W.G. Lima, L.G.R. Ferreira, M.C. Paiva, Domestic wastewater treatment plants as sources of macrolide-lincosamide-streptogramin B- and penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **49**(2), 267-279 (2020).
14. Hospitais Universitários Federais, “POP/CCIH/007/2016 revisado em 2019: Procedimento de coleta de material para cultura”, João Pessoa, 2019, URL: <http://www2.ebserh.gov.br/documents/220250/4375831/POP+DE+COLETA+DE+MATERIAL+PARA+CULTURA.pdf/8a2623ee-d48a-4aa5-8c7e-adc80ee405ea>.
15. S. Pratavieira, *Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos*, Tese, Universidade de São Paulo, 2014, pp. 1-108.
16. A.K. Beyer, G.C.C. Currea, A. Holm, Validity of microscopy for diagnosing urinary tract infection in general practice. A systematic review, *Scand. J. Prim. Health Care*, **37**(3), 373-379 (2019).
17. P. Silva, A.M.M. Carneiro, M.C. Carloni, M.I.C. Medeiros, J.O. Silva, S.H.C. Reche, *et al.*, Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo, *Rev. Inst. Adolf Lutz*, **64**(2), 245-251 (2005).
18. V. R. Freitas, S.U. Picoli, A coloração de Gram e as variações na sua execução, *NewsLab*, **87**, 124-128 (2007).
19. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, “Técnica de Coloração de GRAM”, Ministério de Saúde, Brasília, 2001.
20. G.S. Santos, E.P. Marques, H.A.S. Silva, C.W.B. Bezerra, A.B. Marques, Identificação e quantificação do cristal violeta em aguardentes de mandioca (Tiquira), *Quim. Nova*, **28**(4), 583-586 (2005).
21. M. Mori, R.J. Cassella, Estudo da sorção do corante catiônico violeta cristal por espuma de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio, *Quim. Nova*, **32**(8), 2039-2045 (2009).

22. W.G. Santos, R.S. Scurachio, D.R. Cardoso, Photochemical behavior of Safranine-Riboflavin complex in the degradation of folic acid, *J. Photochem. Photobiol. A*, **293**, 32-39 (2014).
23. J.L.B. Moreira, C.B.M. Carvalho, C.C. Frota, “Visualizações bacterianas e colorações”, Imprensa Universitária, Fortaleza, 2015.
24. J. Mehraj, W. Witte, M.K. Akmatov, F. Layer, G. Werner, G. Krause, Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community, *Curr. Top. Microbiol.*, **387**, 55-87 (2016).
25. Y. Wu, S. Jiang, Z. Fu, Employment of teicoplanin-coated magnetic particles for quantifying grampositive bacteria via catalase-catalyzed hydrolysis reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Talanta*, **211**, 120728 (2020).
26. E.P. Silva, M.A. Carreiro, R.C. Gomes, Metodologia para a identificação de *Staphylococcus* sp. na superfície do colchão da maca no pronto socorro, *Rev. Pró-univerSUS*, **7**(3), 15-19 (2016).
27. J. Lagos, P. Alarcón, D. Benadof, S. Ulloa, R. Fasce, J. Tognarelli, Novel nonsense mutation in the katA gene of a catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain, *Braz. J. Microbiol.*, **47**(1), 177-180 (2016).
28. M.M. Eason, X.X. Fan, The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens, *Microb. Pathog.*, **74**, 50-58 (2014).
29. H.N. Abdelhamid, H.-F. Wu, Selective biosensing of *Staphylococcus aureus* using chitosan quantum dots, *Spectrochim. Acta A*, **188**, 50-56 (2018).
30. M. Peetermans, P. Verhamme, T. Vanassche, Coagulase Activity by *Staphylococcus aureus*: A Potential Target for Therapy?, *Semin. Thromb. Hemost.*, **41**(4), 433-444 (2015).
31. G.M. Costa, U.P. Pereira, D.A.C. Custódio, N. Silva, Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **70**(4), 584-588 (2011).
32. V.N.P. Peres, R.R.B. Moreira, J. Notário, G. Zanusso Júnior, Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* em fossas nasais e mãos de profissionais da saúde no Hospital Santa Lúcia em Maringá-PR, *Rev. Uningá*, **30**(1), 1-11 (2011).
33. S. Thirunavukkarasu, K.C. Rathish, Evaluation of Direct Tube Coagulase Test in Diagnosing Staphylococcal Bacteremia, *J. Clin. Diagn. Res.*, **8**(5), 19-21 (2014).



34. T.C.N. Martinez, S.S. Laborda, A.V.M. Anunciação, M.G.A.A. Almeida, C.C.M. Rocha, D.P.M. Pinheiro, *et al.*, Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais, *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, **1**(2), 48-53 (2001).
35. S. Sah, P. Bordoloi, D. Vijaya, S.K. Amarnath, C. Sheela Devi, V. A. Indumathi, *et al.*, Simple and economical method for identification and speciation of *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative Staphylococci and its validation by molecular methods, *J. Microbiol. Methods*, **149**, 106-119 (2018).
36. J.A. Lindsay, Staphylococci: Evolving Genomes, *Microbiol. Spectr.*, **7**(6), GPP3-0071-2019. (2019).
37. A.H. Nurfarahin, M.S. Mohamed, L.Y. Phang, Culture medium development for microbial-derived surfactants production-an overview, *Molecules*, **23**(5), 1049 (2018).
38. M. Drancourt, D. Raoult, Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria, *PLoS Neglect. Trop. D.*, **1**(2), e83 (2007).
39. E. Yeh, B.A. Pinsky, N. Banaei, E.J. Baron, Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests, *PLoS One*, **4**(7), e6141 (2009).
40. A.L. Santos, D.O. Santos, C.C. Freitas, B.L.A. Ferreira, I.F. Afonso, C.R. Rodrigues, *et al.*, *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **43**(6), 413-423 (2007).
41. T.V.M.D. Simões, A.A. Oliveira, K.M. Teixeira, A.S. Rodrigues Júnior, I.M. Freitas, "Identificação laboratorial de *Staphylococcus aureus* em leite bovino", Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2013.
42. D.C.M. Santos, T.M. Costa, R.F. Rabello, F.A. Alves, S.S.B. Mondino, Mannitol-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens in Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, **46**(2), 531-533 (2015).
43. F.A. Ayeni, C. Andersen, N. Norskov-Lauritsen, Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci, *Microb. Pathog.*, **105**, 255-259 (2017).
44. M.E. Saab, C.A. Muckle, H. Stryhn, J.T. McClure, Comparison of culture methodology for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudinterme-*

- dius* in clinical specimens collected from dogs, *J. Vet. Diagn. Invest.*, **30**(1), 93-98 (2018).
45. D.F.J. Brown, D.I. Edwards, P.M. Hawkey, D. Morrison, G.L. Ridgway, K.J., *et al.*, Towner, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 1000-1018 (2005).
  46. N.L.P. Iorio, R.B.R. Ferreira, R.P. Schuenck, K.L. Malvar, A.P. Brillhante, A.P.F. Nunes, *et al.*, Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates, *J. Clin. Microbiol.*, **45**(8), 2564-2569 (2007).
  47. D.P. Kateete, C.N. Kimani, F.A. Katabazi, A. Okeng, M.S. Okee, A. Nanteza, Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test, *Ann. Clin. Microb. Antimicrob.*, **9**, 23 (2010).
  48. D.G. Araújo, M.E.F. Oliveira, S.R. Oliveira, *Staphylococcus lugdunensis* em hemoculturas: perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, *Rev. Bras. Anal. Clin.*, **49**(4), 376-380 (2017).
  49. Brasil, Agência de Vigilância em Saúde, Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde, “Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica”, ANVISA, Brasília, 2013.
  50. K.S. Fulham, S.L. Lemarie, G. Hosgood, H.L.N. Dick, In vitro susceptibility testing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococci to mupirocin and novobiocin, *Vet. Dermatol.*, **22**, 88-94 (2010).
  51. A. Tambo-Ong, S. Chopra, B.T. Glaser, K. Matsuyama, T. Tran, P.B. Madrid, Mannich reaction derivatives of novobiocin with modulated physicochemical properties and their antibacterial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**(19), 5697-5700 (2011).
  52. Brasil, Agência de Vigilância em Saúde, “Módulo 5: Detecção e identificação de bactérias de importância médica”, ANVISA, Brasília, 2004.
  53. A.M. Ferreira, M.F. Bonesso, A.L. Mondelli, M.L.R.S. Cunha, Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S-23S interspace region molecular weight patterns, *J. Microbiol. Methods*, **91**, 406-411 (2012).

54. E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima, T.M. Kaneko, S.O. Nishikawa, B.R. Freitas, Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**(2), 301-307 (2008).
55. Clinical and Laboratory Standards Institute, “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard”, ninth edition, CLSI, Wayne, 2012.
56. M.H.P. Lira, G.F.Q. Moraes, G.M. Santos, F.P. Andrade Júnior, F.O. Pereira, I.O. Lima, Synergistic antifungal activity of monoterpenes in combination with conventional antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Rev. Ciênc. Med. Biol.*, **19**(2), 258-264 (2020).
57. G.N. McAuliffe, M. Smith, G. Cooper, R.F. Forster, S.A. Roberts, Variability in azithromycin susceptibility results for *Neisseria gonorrhoeae* Obtained using gradient MIC strip and agar dilution techniques, *J. Clin. Microbiol.*, **57**(12), e01353-19 (2019).
58. J. Zurita, C. Mejía, M. Guzmán-Blanco, Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina, *Braz. J. Infect. Dis.*, **14**, S97-S107 (2010).
59. E.H. Campana, C.G. Carvalhaes, P.P. Barbosa, A.M.O. Machado, A.M. Paula, A.C. Gales, Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **47**(2), 157-164 (2011).
60. S. Jean, S. Garrett, C. Anglade, L. Bridon, L. Davies, O.B. Garner, J. Richards, M. Wallace, M. Wootton, C.-A.D. Burnham, Multicenter clinical evaluation of etest meropenem-vaborbactam (bioMérieux) for susceptibility testing of *Enterobacteriales* (*Enterobacteriaceae*) and *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.*, **58**(1), e01205-19 (2020).
61. L.M. Sejas, S. Silbert, A.O. Reis, H.S. Sader, Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **39**(1), 27-35 (2003).
62. L.C. Gelatti, R.R. Bonamigo, A.P. Becker, P.A. d’Azevedo, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade, *An. Bras. Dermatol.*, **84**(5), 501-506 (2009).

63. A.S. Lee, H. Lencastre, J. Garau, J. Kluytmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, S. Harbarth, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **4**, 18033 (2018).
64. T.S.C. Atique, T.A.M. Lima, V.A. Souza, P.F.C. Pacheco, A.A.C. Furini, Sensibilidade à meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto, *Rev. Bras. Farm.*, **93**(3), 347-352 (2012).
65. S. Lakhundia, K. Zhang, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology, *Clin. Microbiol. Rev.*, **31**(4), (2018).
66. V.A.A. Lanes, A.L. Bender, M.B. Delwing, Ajuste de dose no uso de vancomicina na UTI pediátrica de um hospital universitário de Porto Alegre, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **7**(3), 25-29 (2016).
67. V.Y. Obara, C.P. Zacas, C.M.D.M. Carrilho, V.D.A. Delfino, Esquema posológico atualmente utilizado para vancomicina falha em obter níveis terapêuticos em 40% dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva, *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, **28**(4), 380-386 (2016).
68. M.J. Mimica, E.N. Berezin, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente, *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*, **5**(12), 52-56 (2006).
69. A. Breves, C.A.C. Miranda, C. Flores, I. Filippis, M.M. Clementino, Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **51**(3), 143-152 (2015).
70. M.R.E. Perugini, V.H. Perugini, A.R.M. Ferreira, C.F. Oliveira, G.T. Gomes, B.A.R. Lima, A.P.D. Pereira, F.E.C. Marroni, E.C. Vespero, M. Pelisson, M.A.G. Ribeiro, Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011, *Semina: Ciên. Biol. Saúde*, **36**(1), 275-282 (2015).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

G. Fernandes-Queiroga-Moraes, L. Vilar-Cordeiro, F.P. de Andrade-Júnior, Main laboratory methods used for the isolation and identification of *Staphylococcus* spp., *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 5-28 (2021).

# Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves

Maisa Sayuri Nagano<sup>1</sup>, Claudemir Batalini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Farmacêutica-Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso/CUA - Unidade II, Barra do Garças (MT), Brasil. E-mail: maisa\_nagano@hotmail.com

<sup>2</sup> Professor Doutor, Universidade Federal de Mato Grosso/CUA - Unidade I, LAPQUÍM, Pontal do Araguaia (MT), Brasil.

\*Author for correspondence: pirapotimao@msn.com

Received: 14 August 2020

Revised: 2 October 2020

Accepted: 5 October 2020

## SUMMARY

**Introduction:** *Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as neem, has been gaining ground in alternative herbal medicine. This plant offers a constant source of new and unique phytochemicals that are used in the development of new drugs. **Aim:** A preliminary chemical analysis was carried out to detect secondary metabolites present in the crude hydroethanolic extract of dried and macerated leaves of *A. indica* and to evaluate its antioxidant and toxic potential. **Methodology:** The chemical analysis, which was performed according to a procedure described in the literature, identified data positive for phenols, tannins, leucoanthocyanidins, catechins, flavones, flavonoids and xanthenes, and the absence of anthocyanins, anthocyanidins, chalcones, auronos, flavonols and flavanones. **Results:** The quantitative test by the DPPH method, performed in an ultraviolet-visible spectrophotometer, revealed moderate at the highest concentration of 250.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . An investigation of the toxicity potential of the crude extract against larvae of *Artemia salina* Leach, indicated  $\text{LC}_{50} = 596.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , placing it within the range of moderate toxicity when compared to data in the literature. **Conclusion:** These studies therefore indicate that crude hydroethanolic extract of *A. indica* leaves contains substances with medicinal properties and that it is safe for therapeutic purposes.

**Keywords:** Phytochemistry, antioxidant activity, toxicity, medicinal plant.

## RESUMO

### Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e potencial tóxico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (nim)

**Introdução:** *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente como nim, vem se tornando importante na terapia herbal alternativa. A planta oferece uma constante fonte de novos e únicos compostos fitoquímicos, utilizados no desenvolvimento de novos fármacos. **Objetivo:** buscou-se realizar a análise química preliminar para detecção dos metabólitos secundários presentes no extrato bruto hidroetanólico das folhas secas e maceradas de *A. indica* e avaliar o potencial antioxidante e tóxico. **Metodologia:** a análise química foi realizada seguindo-se o procedimento da literatura, informando dados positivos para fenóis, taninos, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis e xantonas e ausência de antocianinas, antocianidinas, chalconas, auronas, flavononóis e flavanonas. **Resultados:** o teste quantitativo pelo método de DPPH, em aparelho ultravioleta-visível, revelou atividade antioxidante moderada, na maior concentração de 250,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A investigação do potencial tóxico frente às larvas de *Artemia salina* Leach indicou  $\text{CL}_{50} = 596,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que comparado a dados da literatura situa-se na faixa de toxicidade moderada. **Conclusões:** dessa forma, os estudos realizados sinalizam que o extrato bruto hidroetanólico das folhas de *A. indica* contém substâncias que possam conferir propriedades medicinais, além do uso seguro para fins terapêuticos.

*Palavras-chave:* Fitoquímica, atividade antioxidante, toxicidade, planta medicinal.

## RESUMEN

### Detección fitoquímica, actividad antioxidante y posible toxicidad de las hojas de *Azadirachta indica* A. Juss (neem)

**Introducción:** *Azadirachta indica* A. Juss, conocida popularmente como nim, ha ido ganando terreno en la medicina alternativa a base de hierbas. Esta planta ofrece una fuente constante de fitoquímicos nuevos y únicos que se utilizan en el desarrollo de nuevos fármacos. **Objetivo:** detectar metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroetanólico crudo de hojas secas y maceradas de *A. indica* y evaluar su potencial antioxidante y tóxico, para ello se realizó un análisis químico preliminar. **Metodología:** el análisis químico, que se realizó según un procedimiento descrito en la literatura, identificó datos positivos para fenoles, taninos, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonoides y xantonas, y la ausencia de antocianinas, antocianidinas, chalconas, auronas,

flavonoles y flavanonas. **Resultados:** la prueba cuantitativa por el método DPPH, realizada en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, reveló actividad antioxidante moderada en la más alta concentración de 250,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Una investigación del potencial de toxicidad del extracto crudo contra larvas de *Artemia salina* Leach} indicó  $\text{LC}_{50} = 596.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ubicándolo dentro del rango de toxicidad moderada en comparación con los datos de la literatura. **Conclusión:** por tanto, estos estudios indican que el extracto hidroetanólico crudo de hojas de *A. indica* contiene sustancias con propiedades medicinales y que es seguro para fines terapéuticos.

*Palabras clave:* Fitoquímica, actividad antioxidante, toxicidad, planta medicinal.

## INTRODUCTION

Plants sustain life on Earth, performing extraordinary functions because they are the essence of the food chain. In addition, they supply oxygen to all living things, and possess medicinal properties. Indeed, Brazil stands out for the significant market share of its herbal products and for its research efforts aimed at the development of new drugs [1].

Little research has so far focused on the use of secondary metabolites such as phenols, tannins, and flavonoids, which have a potential for antioxidant activity, to substitute some synthetic food additives, and on identifying other possible health benefits of antioxidants. Therefore, quantitative, and qualitative research into these metabolites has become increasingly relevant. The identification of natural bioactive compounds is of utmost importance in the search for new drugs. Phytochemical compounds are found in various combinations in different parts of the plant (leaves, roots, shoots, bark), in different stages of growth (germination, maturation), and under different environmental pressures [2].

*Azadirachta indica* A. Juss (neem) is a plant of Asian origin, of the family Meliaceae, native to Myanmar and the arid regions of India [3]. The species has been used for centuries in the East as a medicinal plant (in the treatment of inflammation, viral infections, hypertension, and fever), as a shade tree, an insect repellent, as construction material, fuel, lubricant, fertilizer, and pesticide [4]. The leaf extract can act as a growth promoter [5]. Other authors have also investigated and identified other functions related to improved performance, hematological parameters [6] and immune response in animals [7, 8]. Compounds extracted from the plant are selective and non-mutagenic, biodegrading rapidly, with low toxicity to non-target organisms and with minimal disturbance to ecosystems [9].

*A. indica* seeds and leaves are widely used to control pests [10, 11]. This behavior is largely due to the presence of toxic triterpenes, with emphasis on azadirachtin and some of its derivatives [12, 13]. Much higher concentrations of azadirachtin have been found in the seeds than in other parts of this plant [14]. In addition to azadirachtin and its derivatives, other substances with interesting biological applications against insects have been isolated, such as vilasinin [15], salanin and meliantrol [16].

This study focused on the phytochemical identification of different classes of secondary metabolites present in the hydroethanolic extract of *A. indica* (neem) leaves, as well as an investigation into their antioxidant and toxic potential.

## MATERIAL AND METHODS

### Collection and processing the plant material

The leaves of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) used in this study were collected in September 2016 in the Zeca Ribeiro neighborhood of the municipality of Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil, at the geographical coordinates of 15°54'03.5"S 52°16'39.1"W. Using a knife and pruning shears, about 5 kg of the material were collected for the chemical study and analysis. The plant was taxonomically identified at the Herbarium of the Federal University of Mato Grosso (UFMT/CUA) - Unit I, Pontal do Araguaia (MT), registered under number 10 216. Initially, the leaves were dried without exposure to the sun, at room temperature for 7 days. The branches of the leaves were then removed and only the leaves were ground into a powder in a blender.

### Preparation of the crude extract of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves

The powdered plant material (2558.0 g) was extracted for about 45 days with approximately 12 L of a solution of ethanol: distilled water (8:2) at room temperature, protected from light, with occasional shaking. After this period, the extract was filtered to separate the solid material from the hydroethanolic extract. The solvent was recovered by rotary vacuum evaporation (Quimis) at 60 °C. The crude leaf extract was then oven-dried at 50-60 °C for about 7 days until it reached a constant weight, whereupon its yield was calculated. After this process, the crude extract was then stored at 7-10 °C to prevent its degradation.

### Phytochemical analysis

Phytochemical tests were performed in seven test tubes, as described by Matos [17], with minor adaptations, based on chemical reactions with specific reagents, which will be described below, based on color changes. Initially, 0.5 g of the crude dry extract from



*A. indica* leaves were suspended in 50 mL of ethanol: distilled water (8:2), and 3 mL of this solution was poured into each test tube for analysis. The secondary metabolites described below were then examined.

### **Phenols and tannins**

Three drops of 5% ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) ethanolic solution were poured into tube 1, which was then shaken vigorously, causing a change in color or the formation of a precipitate. The appearance of a color varying between blue and red is indicative of the presence of phenols (negative blank test), while the formation of dark blue precipitate indicates the presence of pyrogallol tannins (hydrolyzable tannins) and green indicates that of condensed or catechin tannins.

### **Anthocyanins, anthocyanidins, flavonoids, chalcones and aurones**

In this experiment, tubes 2, 3 and 4 were used. Tube 2 was acidified to pH 3.0 by adding  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  of aqueous hydrochloric acid solution (HCl), while tubes 3 and 4 were alkalized to pH 8.5 and 11, respectively, by adding  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  of an aqueous solution of sodium hydroxide (NaOH). The color change in each tube indicated the presence of several chemical constituents, as described in table 1.

### **Leucoanthocyanidins, catechins and flavanones**

The content of tube 5 was acidified to a pH level of 1.0-3.0 by adding an aqueous solution of  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  of HCl. Tube 6 was alkalized to pH 11.0 by adding an aqueous solution of  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  of NaOH. The tubes were then heated carefully over a Bunsen burner for 2 to 3 min. A comparison of the color of the contents of these tubes with the corresponding tubes used in the previous test revealed changes. The appearance or intensification in color indicated the presence of the constituents listed in table 1.

### **Flavonoids, flavonols and xanthones**

A few milligrams of magnesium granules and 0.5 mL of concentrated HCl were added to tube 7. At the end of the reaction, which was indicated by the end of effervescence, a color change was observed when compared with tube 5 used in the previous test (both acidified). The appearance or intensification of the red color indicates the presence of flavonoids, flavanols and/or xanthones in their free forms or their heterosides.

### **Quantitative antioxidant activity determined by UV-Visible spectroscopy (UV-Vis)**

Literature procedures were followed [18, 19], with a few adaptations.

**Table 1.** Color change indicating the presence of different constituents, according to pH level.

Secondary metabolites	Color in medium		
	Acid (pH 3.0)	Alkaline (pH 8.5)	Alkaline (pH 11.0)
Anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids	Red	mauve	purplish blue
Chalcones and auronos	Red	---	purplish red
Leucoanthocyanidins	Red	---	---
Catechins (catechin tannins)	Yellow ochre	---	---
Flavanones	---	---	reddish orange
Flavonoids, flavonols and xanthonos	Bright red	---	---

Source: Adapted from Biswas *et al.* [17].

### Preparation of the DPPH solution for the test

A stock solution of 50 mL of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH-Sigma-Aldrich), weighing 0.0125 g, was prepared in an analytical balance (Metler) and diluted in methanol to the desired volume, resulting in a final solution of 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Seven dilutions were prepared from the stock solution, in the following concentrations: 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . These solutions were protected from light by means of aluminum foil and stored in a refrigerator until used.

The standard curve was drawn from the absorbance value at 515 nm, obtained in an SP 2000 UV-Vis spectrophotometer. This standard curve was obtained using approximately 3.0 mL of the solutions, which were transferred to glass cuvettes with an optical path length of 1.0 cm, where the reading was performed, using methanol (Vetec) as blank. Absorbance measurements were taken in triplicate, with a 1-min interval between each reading.

### Dilutions of the extract and the positive control

A quantity of 0.0500 g of the crude extract was carefully weighed on an analytical balance (Metler) and this amount was dissolved in 25 mL with methanol (Vetec), resulting in a concentration of 2.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Solutions with concentrations of 25, 50, 100, 150, 200 and 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were prepared by dilution from this stock solution and were used to perform the antioxidant test.

Rutin (Sigma-Aldrich) was used for the positive control, employing the same dilution procedure as that of the extracts described above. The resulting solutions were kept away from light and stored in a refrigerator until the moment they were used for the tests.

### Antioxidant testing procedure

The solutions used in this test were prepared using 0.3 ml of each concentration of the extracts and the control, to which 2.7 mL of the DPPH solution at  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were added in test tubes protected from light. The absorbance readings were taken after 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min. The blanks used here were 2.7 mL of methanol and 0.3 mL of each concentration of the extracts. For the positive control blank, 2.7 mL of methanol and 0.3 mL of each concentration of the control were also used.

### Percentage of residual DPPH

The percentage of residual DPPH (% DPPH<sub>RES</sub>) was determined based on the equation of the calibration curve and the absorbance values over a period of 30 min for each concentration:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{RES}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=t}}{[\text{DPPH}]_{T=0}} \cdot 100$$

where  $[\text{DPPH}]_{T=t}$  corresponds to the concentration of DPPH after the reaction with the extracts and positive control, while  $[\text{DPPH}]_{T=0}$  is the initial concentration of DPPH, i.e.,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### Percentage of antioxidant activity

The absorbance values of all the tested concentrations were converted into percentage of antioxidant activity (% AA), determined by the following equation:

$$\% \text{ AA} = \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \cdot 100$$

where  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is the initial absorbance of the DPPH solution and  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  is the absorbance of the reaction mixture (DPPH + sample).

### Evaluation of the potential toxicity of *Azadirachta indica* (neem) leaves

The potential toxicity of the crude hydroethanolic extract obtained from leaves of *A. indica* against larvae of *Artemia salina* Leach was evaluated according to the procedures proposed by Meyer *et al.* [20], with some modifications, and to descriptions in the literature [21-23].

*A. salina* larvae were obtained from eggs supplied by the company Artemia Salina do RN. These eggs were placed for 24 h in an aqueous solution of 0.037 g.mL<sup>-1</sup> (m/v) of sea salt (Mossoró) to hatch. The pH level of the solution was adjusted to 7.0 by adding 0.1 mol.L<sup>-1</sup> aqueous NaOH solution, under constant aeration and light from a 40W lamp (around 27-28 °C).

A standard solution with a concentration of 5 mg.mL<sup>-1</sup> was then prepared by diluting 50 mg of the crude extract in methanol. From this standard solution, 15, 50, 100, 500, 600 and 700 µL were transferred to test tubes, which were heated in an oven at 50 °C until the solvent was completely evaporated. This procedure was performed in triplicate.

After total evaporation of the solvent, 3 mL of saline solution were added to each tube, followed by 10 *A. salina* larvae, and the volume of the test tube was completed by adding up to 5 mL saline solution. The final concentrations in the test tubes were 15, 50, 100, 500, 600 and 700 µg.mL<sup>-1</sup>.

The control tube was prepared containing only 5 mL of saline and 10 *A. salina* larvae. After 24 h of exposure, the number of surviving larvae was counted with the aid of a magnifying glass and a glass rod. Larvae that remained immobile for more than 10 seconds after mildly shaking the tubes were considered dead. The average lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of each investigated ester and starting compounds was then calculated based on the concentrations under study, using StatPlus 2008 software [24].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characteristics of the powdered material, crude extract, and yield

The dried neem leaves were ground into a green powder in order to prepare the crude hydroethanolic extract. The dry crude extract was dark green, with a pasty consistency and a strong odor characteristic of plant material. A total amount of 197.0 g of crude extract was obtained (7.7% yield).

### Phytochemical analysis

Table 2 shows the results of the qualitative analysis of the metabolites investigated in this work. The change in color indicative of the presence of the classes of these substances, according to the literature [17] is described in table 1.

**Table 2.** Secondary metabolites identified in the crude hydroethanolic extract obtained from the leaves of *Azadirachta indica* (neem).

Class of metabolites investigated	Result
Phenols	( + )
Tannins (condensed or catechin)	( + )
Tannins (pyrogalllic or hydrolyzable)	( - )
Anthocyanins, Anthocyanidins and Flavonoids	( - )
Chalcones and Aurones	( - )
Leucoanthocyanidins	( + )
Catechins (catechin tannins)	( + )
Flavanones	( - )
Flavononols, Flavonols and Xanthones	( + )

**Note:** ( + ) = positive; ( - ) = negative.

The chemical method used in the analysis of phenols (tube 1) was based on the reaction of the phenolic groups with the ferric chloride reagent, forming iron complexes and producing blue pigments [25]. Thus, it was reactive to the presence of phenolic compounds in the sample, presenting a darker color than that of the blank, which consisted only of ferric chloride solution.

Tube 1 was also used to identify tannins. The addition of ferric chloride drops to the aliquot of the extract solution (tube 1) would immediately produce a bluish precipitate in the presence of hydrolyzable tannins (pyrogalllic), or a greenish precipitate in the presence of condensed tannins (catechin), thus rendering the reaction specific in determining the two classes of tannins, as shown in table 1. These compounds are easily oxidized by specific plant enzymes and by metals such as the ferric chloride used here, causing the solutions to darken [26]. The reaction produced a dark green precipitate, which, according to the literature, confirms the presence of condensed or catechin tannins, and hence, the absence of pyrogalllic or hydrolyzable tannins.

No compounds were detected in the tests to identify anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids in tubes 2, 3 and 4, in view of the absence of red in the acidic medium (pH 3.0), of mauve in the alkaline medium (pH 8.5) and of purplish blue in the alkaline medium (pH 11.0). The same applies to the chromatic tests for chalcones and aurones, which showed no changes in the colors of tubes 2, 3 and 4.

Positive results were obtained for the presence of leucoanthocyanidins and catechins (catechin tannins), indicated by darkening of the color in tube 5 and the absence of color change in tube 6. The presence of catechin tannins had already been revealed in the test with ferric chloride (tube 1). As for flavanones, the result was negative (tube 6), as indicated by the absence of a reddish orange hue, and the color remained purplish red (tube 4, pH 11.0, without heating).

Tube 7 showed a positive result for flavonoids, flavonols and xanthones. This reaction is caused by the reduction of yellow flavonoid derivatives, which take on a reddish color in the presence of magnesium in a strongly acidic medium, and a bluish color in the presence of anthocyanins, as previously reported [27]. The reaction was positive since the color tube 7 intensified.

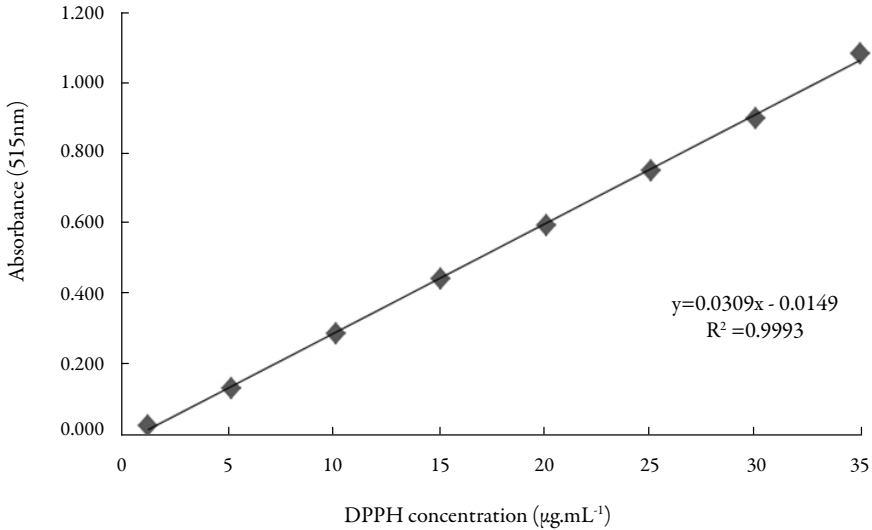
The results in table 2 indicated the presence of secondary metabolites commonly related to antioxidant properties, mainly phenols, tannins and catechins. Phytochemical studies with alcoholic extracts of *A. indica* in semi-arid regions of Nigeria indicated moderate amounts of phenols, tannins, and flavonoids [28].

The presence or absence of certain classes of metabolites present in the leaves of *A. indica* may vary according to geographical position and climatic aspects [29]. This statement is shared by Ghimeray *et al.* [30], in their studies of quantification of phenolic derivatives of *A. indica* leaves from Nepal.

The plant *A. indica* (neem) is originally from Asia and having been adapted in several parts of the world, including Brazil. Many studies of the plant are reported in the literature related to different biological activities, among them the antioxidant activity. More than 140 substances have already been isolated from different parts of the plant (bark, flowers, leaves, fruits, roots, and seeds), many of these biologically active substances [31].

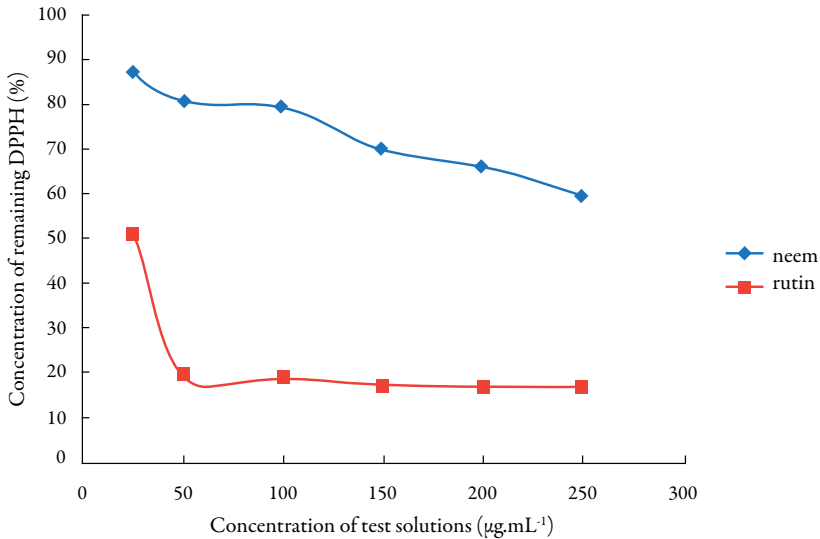
#### **Quantitative antioxidant activity determined by UV-Visible spectroscopy (UV-VIS)**

The calibration curve of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical in the test was  $A = 0.0309C + 0.0149$ , where C corresponds to the concentration of DPPH in the medium, A is the absorbance measured at a wavelength of 515 nm, and the correlation coefficient  $R = 0.9999$ , which was determined using StatPlus 2008 software (figure 1).



**Figure 1.** DPPH calibration curve.

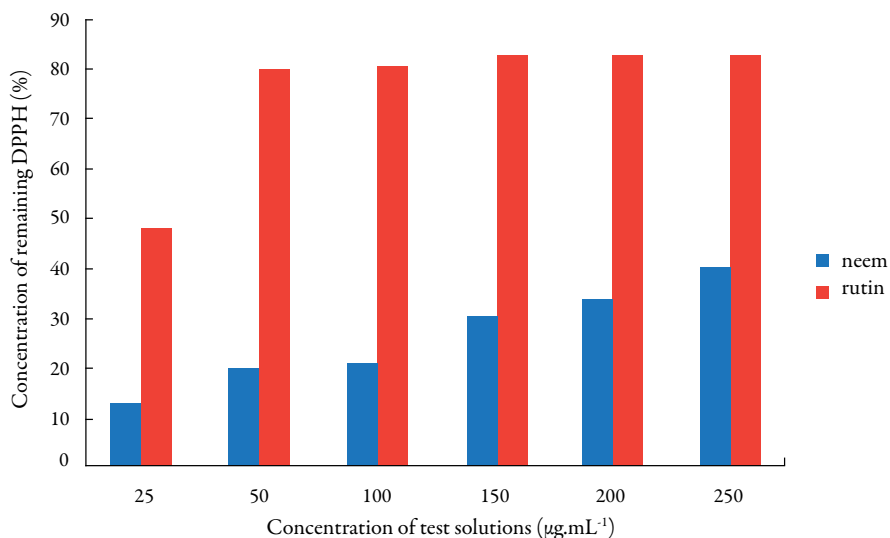
From the calibration curve and the absorbance values over 30 min at each tested concentration of the sample and the positive control, the residual DPPH values (% DPPH<sub>RES</sub>) (figure 2) were determined using the equation (% DPPH<sub>RES</sub> =  $[\text{DPPH}]_{T=\tau} / [\text{DPPH}]_{T=0} \times 100$ ), where  $[\text{DPPH}]_{T=\tau} = C$ , as mentioned in the materials and method section.



**Figure 2.** Percentage of residual DPPH after the reaction with different concentrations of hydroalcoholic extract from leaves of neem (*A. indica*) and rutin.

The results illustrated figure 2 confirm the moderate antioxidant activity of neem, indicated by a decrease in the amount of residual DPPH. However, when the highest tested concentration was used ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 59.06% of the free radical was still present in the radical form.

Figure 3 compares the antioxidant potential of neem leaves and rutin (control). This comparison reveals a difference between the compounds, with the crude hydroethanolic extract of neem leaves showing moderate antioxidant activity, albeit still able to properly sequester the DPPH present in the reaction medium.



**Figure 3.** Percentage of antioxidant activity with different concentrations of hydroalcoholic extract from leaves of neem (*A. indica*).

The absorbance values at all the tested concentrations, within a 30-min period, were also converted into percentage of antioxidant activity (% AA), determined by the equation  $(\% \text{ AA} = \{[\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})] \times 100\} / \text{Abs}_{\text{control}})$ , where  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is the initial absorbance of the methanol solution of DPPH and  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  is the absorbance of the reaction mixture (DPPH + sample). The % AA value found in the sample was 40.3%, which can be considered a moderate degree antioxidant activity.

Analysis of the antioxidant activity of *A. indica* (neem) in Nepal [30] indicated % AA values of 33% for crude methanolic extract obtained from the leaves, a result in line with that obtained in this work, while 82.5% for the bark extract. Antioxidant properties of *A. indica* leaves present in India and England have also been reported [32, 33].

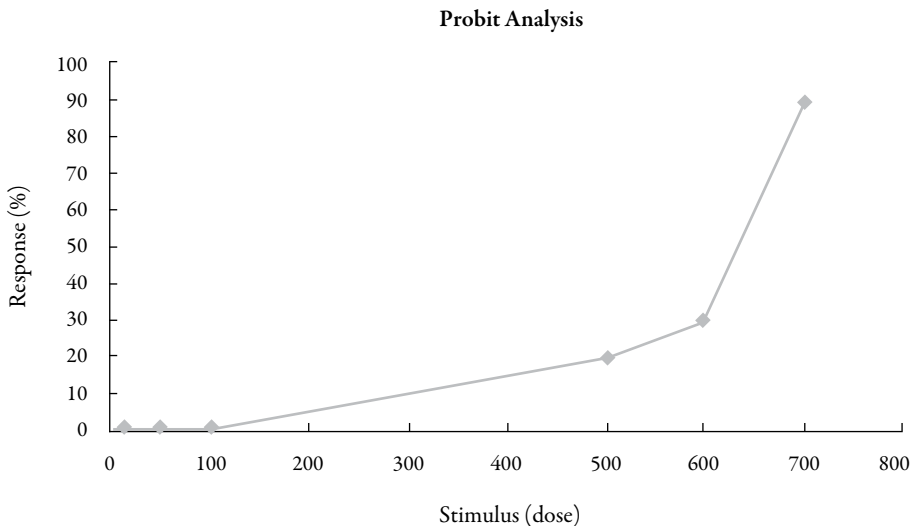


Phenolic compounds are secondary metabolites responsible for the antioxidant activity exhibited by several sources of natural products. In China, this relationship was well evidenced in a study with 112 traditional plants, among them with leaves of *A. indica* (neem) [34].

This moderate antioxidant activity was confirmed by the phytochemical analysis. We also found that the absence of a part of the phenolic compounds, particularly the flavonoids present in neem leaves, indicates a decrease in the potential antioxidant activity. Thus, the antioxidant capacity obtained was in large part due to the presence of phenolic groups in the chemical structures of the secondary metabolites, mainly in phenols and tannins, which are markedly present in the crude hydroethanolic extract of *A. indica* leaves.

#### Evaluation of potential toxic effects on *Artemia salina* Leach larvae

The potential toxicity of the crude hydroethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves was tested, using as parameter the lethal concentration sufficient to kill 50% of *Artemia salina* larvae,  $LC_{50}$ , after 24 h of exposure to concentrations of 15, 50, 100, 500, 600 and 700  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of saline solution of the crude extract of *A. indica* leaves. Figure 4 depicts the dose-response curve of the test performed.



**Figure 4.** Analysis of the toxicity of crude hydroethanolic extract of *A. indica* (neem) leaves against *Artemia salina* larvae. The x-axis represents the dose of the extract in  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the y-axis represents the effect in percentage of deaths.

Studies have been published describing the standard use of *Artemia salina* larvae to determine the toxic effects of pure substances [35, 36], of plant extracts [37], and even of nanoparticulate systems [38]. Our study used as reference the standard proposed by Nguta *et al.* [37], because it clearly involves studies on the toxic potential of a plant extract against *A. salina* larvae.

According to Nguta *et al.* [37], both organic and aqueous plant extracts whose  $LC_{50}$  is lower than  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  are highly toxic, while  $LC_{50}$  between 100 and  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  is moderately toxic,  $LC_{50}$  between 500 and  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  corresponds to low toxicity, and  $LC_{50}$  above  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  is nontoxic. The test to determine potential toxicity of the raw extract of *A. indica* (neem) leaves showed an  $LC_{50}$  value of  $596.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , with a confidence interval (95% CI) of 549.6 to  $647.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Thus, a comparison of our result with this reference indicates that the crude extract under study exhibits low toxicity.

Among the various parts of the plant *A. indica* (neem), results of high toxic potential have been found in seed oil [9, 14, 39]. Studies relate this high toxicity to the presence of some substances, mainly azadirachtin, vilasinin, salanin and melianrol [12, 13, 15, 16], with emphasis on azadirachtin. This substance was detected in high concentrations in *A. indica* seed oil in India [40, 41]. Bioinsecticides produced from neem seed oil are already commercially available, in line with some of the principles of Green Chemistry.

In contrast to seed oil, the presence of azadirachtin in other parts of the plant (leaves, branches, and bark) is not common [9, 14]. The amount of the azadirachtin present in the leaves of *A. indica* in southern India was about 33 times less than in the oil of the seeds, that is, practically zero [40]. This may justify the low toxicity value generally found in the extracts obtained from the leaves of neem [42], as occurred in this work.

According to literature [20], lethal concentrations below  $1000.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  indicate the presence of potentially active substances. Therefore, the concentration of  $596.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  indicates that crude hydroethanolic extract of *Azadirachta indica* (neem) leaves contains substances with potential medicinal properties.

## CONCLUSIONS

This phytochemical study of the crude extract of *A. indica* leaves revealed the significant presence of several secondary metabolites such as phenols, tannins, leucoanthocyanidins, flavonoids, flavonols and xanthenes. This plant extract showed a moderate antioxidant potential against the DPPH radical, with 40.3% antioxidant activity (% AA) at the concentration of  $250.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . This moderate activity may be related to the presence mainly of known metabolites with antioxidant potential, such as phenols

and tannins, as well as the absence of flavonoids. The  $LC_{50}$  of the crude leaf extract ( $596.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) confirms its low toxicity, indicating its possible safe and beneficial use in popular home remedies. It also indicates that the crude extract may contain secondary metabolites with interesting pharmacological properties. This study should contribute to the development of future research projects focusing on other biological activities of *Azadirachta indica* A. Juss (neem).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Federal University of Mato Grosso (UFMT) at Araguaia, and the researchers of the LAPQUÍM - Natural Products Research at UFMT for their invaluable support.

## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## REFERENCES

1. R.C. Dutra, M.M. Campos, A.R. Santos, J.B. Calixto, Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges, and perspectives, *Pharmacol. Res.*, **112**, 4-29 (2016).
2. S. B. McCreath, R. Delgoda, Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In: "Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies", Academic Press, San Diego (CA), 2016, pp. 93-100.
3. R.C. Saxena, Naturally occurring pesticides and their potential, In: "Chemistry and world food supplies", Pergamon Press, Ontario, Canada, 1983, pp. 143-162.
4. S.A.G. Mossini, C. Kimmelmeier, A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos, *Acta Farm. Bonaerense*, **24**(1), 139-148 (2005).
5. N. Landy, G. Ghalamkari, M. Toghiani, F.F. Yazdi, Humoral immune responses of broiler chickens fed with antibiotic and neem fruit powder (*Azadirachta indica*) as feed additive supplemented diet, 2011 International Conference on Life Science and Technology, International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering (IPCBE), IACSIT Press, Singapore, 2011, vol. 3, pp. 153-155.

6. H.B.S. Nayaka, B. Umakantha, S.W. Ruban, H.N.N. Murthy, H.D. Narayanaswamy, Performance and hematological parameters of broilers fed neem, turmeric, vitamin E and their combinations, *Emirates J. Food Agricult.*, **25**(6), 483-488 (2013).
7. H.B.S. Nayaka, B. Umakantha, S. W. Ruban, H.N.N. Murthy, H.D. Narayanaswamy, Effect of neem, turmeric, vitamin E and their combinations on immune response in broilers, *Global Veterinaria*, **9**(4), 486-489 (2012).
8. Z. Jawad, M. Younus, M.U. Rehman, A. Maqbool, R. Munir, K. Muhammad, R.A. Korejo, I.H. Qazi, Effect of neem leaves (*Azadirachta indica*) on immunity of commercial broilers against new castle disease and infectious bursal disease, *African J. Agricult. Res.*, **8**(37), 4596-4603 (2013).
9. M.R. Forim, V.E. Cornélio, M.F.G.F. Silva, E. Rodrigues-Filho, J.B. Fernandes, P.C. Vieira, S.S. Martinez, M.P. Napolitano, R.A. Yost, Chemical characterization of *Azadirachta indica* grafted on *Melia azedarach* and analyses of azadirachtin by HPLC-MS-MS (SRM) and meliatoxins by MALDI-MS, *Phytochem. Anal.*, **21**(4), 363-373 (2010).
10. H. Schmutterer. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*, *Annu. Rev. Entomol.*, **35**, 271-297 (1990).
11. S.S. Martinez, "O Nim *Azadirachta indica* natureza, usos múltiplos, produção, Londrina: IAPAR", 2002.
12. N. Ramji, K. Venkatakrisnan, K.M. Madyastha, 11-epi-azadirachtin D: an epimeric azadirachtin analogue from *Azadirachta indica*, *Phytochemistry*, **49**(1), 265-267 (1998).
13. B.S. Siddiqui, F. Afshan, S. Faizi, Three novel tetracyclic triterpenoids of biogenetic interest from the leaves of *Azadirachta indica*, *Tetrahedron*, **57**(52), 10281-10286 (2001).
14. L.G. Soon, D.G. Bottrell, "Neem pesticides in rice; potencial and limitations", IRRI, Manila, 1994, p. 64.
15. K. Biswas, I. Chattopadhyay, R.K. Banerjee, U. Bandyopadhyay, Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*), *Current Science*, **82**(11), 1336-1345 (2002).
16. C.R. Naraynan, R.P. Singh, D.D. Sawaikar, Phagodeterrence of various fractions of neem oil against *Schistocerca gregaria* Forsk, *Indian J. Entomol.*, **43**(3), 469-472 (1980).

17. F.J.A. Matos, "Introdução à fitoquímica experimental", EUFC, Fortaleza, 1988, p. 15-66.
18. C.M.M Sousa, H.R. Silva, G.M. Vieira Junior, M.C.C. Ayres, C.L.S. Costa, D.S. Araújo, L.C.D. Cavalcante, E.D.S. Barros, P.B.M. Araújo, M.S. Brandão, M.H. Chaves, Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Quím. Nova*, **30**(2), 351-355 (2007).
19. M.P. Torre, R.Y. Cavero, M.I. Calvo, J.L. Vizmanos, A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo, *Antioxidants*, **8**(5), 142-152 (2019).
20. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents, *Planta Med.*, **45**(5), 31-34 (1982).
21. P. Sorgeloos, C.R. Van Der Wielen, G. Persoone, The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests. A critical analysis, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **2**(3-4), 249-255 (1978).
22. A.L. Parra, I.G. Sardiñas, R.S. Yhebra, L.I. Buelba, Comparative study of the assay of *Artemia salina* Leach and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, *Phytomedicine*, **8**(5), 395-400 (2001).
23. B.M. Pour, S. Sasidharan, In vivo toxicity study of *Lantana camara*, *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, **1**(3), 230-232 (2011).
24. C. Lhullier, P. Horta, M. Falkenberg, Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*, *Rev. Bras. Farmacognosia*, **16**(2), 158-163 (2006).
25. M.L.C. Silva, R.S. Costa, A.S. Santana, M.G.B. Koblitz, Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais, *Semina: Ciências Agrárias*, **31**(3), 669-682 (2010).
26. J.M. Monteiro, U.P. Albuquerque, E.L. Araujo, E.L.C. Amorim, Taninos: uma abordagem da química à ecologia, *Quím. Nova*, **28**(5), 892-896 (2005).
27. J.A.Z. Zuanazzi, J.A. Montanha, Flavonóides. In: "Farmacognosia: da planta ao medicamento", 5 ed., Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003, pp. 576-614.

28. A.A.G. Benisheikh, F.M. Muhammad, H. Kelluri, Z.M. Aliyu, U.B. Mallam, M.W. Jibrin, Phytochemical extraction and antimicrobial studies on crude leaf extract of *Azadirachta indica* (Neem) in semi-arid region of Borno State, Nigeria, *Int. J. Res. Review*, **6**(12), 516-522 (2019).
29. I. Shu'aibu, J.B. Hamman, L.J. Goje, A.M. Mu'inat, H.A. Jauro, M.Y. Kabiru, Phytochemical analysis and evaluation of bacteriostatic effect of neem (*Azadirachta indica*) leaves on some clinical bacterial isolates, *J. Harmonized Res. Appl. Sci.*, **3**(3), 152-157 (2015).
30. A.K. Ghimeray, C. Jin, B.K. Ghimire, D.H. Cho, Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta indica* A. Juss grown in foothills of Nepal, *African J. Biotechnol.*, **8**(13), 3084-3091 (2009).
31. R. Subapriya, S. Nagini, Medicinal properties of neem leaves: a review, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5**(2), 149-156 (2005).
32. C.B. Wandscheer, J.E. Duque, M.A.N. da Silva, Y. Fukuyama, J.L. Wohlke, J. Adelman, J.D. Fontana, Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*, *Toxicon*, **44**(8), 829-835 (2004).
33. A. Salehzadeh, A. Akhkha, W. Cushley, R.L.P. Adams, J.R. Kusel, R. H. C. Strang, The antimutagenic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**(7), 681-689 (2003).
34. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences*, **74**(17), 2157-2184 (2004).
35. V.F. Noldin, V.C. Filho, F.D. Monache, J.C. Benassi, I.L. Christmann, R.C. Pedrosa, R.A. Yunes, Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil, *Quím. Nova*, **26**(3), 331-334 (2003).
36. R.L. Cansian, A.B. Vanin, T. Orlando, S.P. Piazza, B.M.S. Puton, R.I. Cardoso, I.L. Gonçalves, T.C. Honaiser, N. Paroul, D. Oliveira, Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*, *Braz. J. Biol.*, **77**(1), 155-161 (2017).
37. J.M. Nguta, J.M. Mbaria, D.W. Gakuya, P.K. Gathumbi, J.D. Kabasa, S.G. Kiama, Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae), *Pharmacology Online*, **2**, 458-478 (2011).

38. S. Rajabi, A. Ramazani, M. Hamidi, T. Naji, *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles, *DARU J. Pharm. Sci.*, **23**(1), 20-30 (2015).
39. A.H.V. Bevilacqua, I.B. Suffredini, M.M. Bernardi, Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro, *Rev. Inst. Ciências da Saúde*, **26**(2), 157-160 (2008).
40. K.M.S. Sundaram, Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects, *J. Environment. Sci. Health*, **31**(4), 913-948 (1996).
41. S. Abdel-Shafy, A.A. Zayed, *In vitro* acararicidal effect of plant extract of Neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae), *Veterinary Parasitol.*, **106** (1), 89-96 (2002).
42. R.M. Martinez, C.R. Souza, C.P.B. Melo, M.M. Baracat, N.S. Arakawa, J.C. Duarte, W.A. Verri Jr., R. Casagrande, S.R. Georgetti, Prevention of UVB radiation-induced oxidative stress in mice by topical administration of *Azadirachta indica* (neem) extract, *J. Basic Appl. Pharm. Sci.*, **41**, e 633 (2020).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

M.S. Nagano, C. Batalini, Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 29-47 (2021).

# Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Paulo Roberto Barros Gomes<sup>1\*</sup>, Gilson Vitorino de Assunção<sup>2</sup>, Gustavo Oliveira Everton<sup>2</sup>, Helson Souza de Lima<sup>2</sup>, Jorge Ricardo Fernandes de Araújo<sup>3</sup>, Eduardo Fonseca Silva<sup>2</sup>, Andréa Vasconcelos Melo<sup>2</sup>, Hilton Costa Louzeiro<sup>4</sup>, Jonas Batista Reis<sup>2</sup>, Victor Elias Mouchrek Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Paragominas, PA, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

<sup>3</sup> Hospital de Urgência e Emergência Dr Clementino Moura.

<sup>4</sup> Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro, MA, Brasil.

\*Corresponding author: prbgomes@yahoo.com.br

Received: 14 July 2020

Revised: 5 October 2020

Accepted: 8 October 2020

## SUMMARY

**Aim:** We determined the chemical composition and larvicidal activity of the essential oil distilled from the *Citrus sinensis* (L.) Osbeck husks and the pattern of the major constituent. **Materials and methods:** For this, we distill the oil by hydrodistillation, identify the components by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), test the larvicidal activity against *Aedes aegypti* and calculate the lethal concentration at 50% (LC<sub>50</sub>) by the Reed-Muench method and the confidence interval by the Pizzi method for both oil and standard. **Results:** it showed that the oil consists mostly of limonene and showed larvicidal activity (LC<sub>50</sub> of 199.01 (± 2.10) µg·mL<sup>-1</sup>) greater than the lemonade standard (126.03 (± 2.09) µg·mL<sup>-1</sup>). **Conclusion:** Therefore, we conclude that distilled oil has the potential to replace chemical larvicides.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, larvae, volatile compounds, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, distilled oil.



## RESUMO

### Composição Química e atividade larvica do óleo essencial das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

**Objetivo:** determinamos a composição química e a atividade larvica do óleo essencial destilado das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e do padrão do constituinte majoritário. **Materiais e métodos:** para isso, destilamos o óleo por hidrodestilação, identificamos os componentes por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), testamos a atividade larvica contra o *Aedes aegypti* e calculamos a concentração letal a 50% (CL<sub>50</sub>) pelo método Reed-Muench e o intervalo de confiança pelo método de Pizzi tanto para o óleo quanto para o padrão. **Resultados:** o óleo é constituído em sua maior parte por limoneno e apresentou atividade larvica (CL<sub>50</sub> de 199,01 (± 2,10) µg·mL<sup>-1</sup>) maior que o padrão limoneno (126,03 (± 2,09) µg·mL<sup>-1</sup>). **Conclusões:** portanto, concluímos que o óleo destilado tem potencial para substituir os larvica químicos.

*Palavras-chave:* *Aedes aegypti*, larvas, compostos voláteis, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, óleo destilado.

## RESUMEN

### Composición química y actividad larvica del aceite esencial de corteza de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

**Objetivo:** determinamos la composición química y actividad larvica del aceite esencial destilado de las cáscaras de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y el patrón del constituyente mayoritario. **Materiales y métodos:** para ello destilamos el aceite por hidrodestilación, identificamos los componentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), testeamos la actividad larvica frente a *Aedes aegypti* y calculamos la concentración letal al 50% (CL<sub>50</sub>) por el método Reed- Muench y el intervalo de confianza por el método de Pizzi tanto para aceite como para la muestra estándar. **Resultados:** el aceite consiste principalmente en limoneno y mostró actividad larvica (CL<sub>50</sub> de 199,01 (± 2,10) µg·mL<sup>-1</sup>) mayor que el estándar de limonada (126,03 (± 2,09) µg·mL<sup>-1</sup>). **Conclusiones:** por lo tanto, concluimos que el aceite destilado tiene el potencial de reemplazar los larvicidas químicos.

*Palabras clave:* *Aedes aegypti*, larvas, compuestos volátiles, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, aceite destilado.

## INTRODUCTION

The methods used to control the mosquito or larvae of *Aedes aegypti* have advantages and disadvantages. Previous studies have shown that the method of predation by fish *Trichogaster trichopteros* and *Astyanax fasciatus* was effective only for larvae, but not for adults, while chemical insecticides based on carbamates, pteroids and organophosphates are effective for both at low concentration, but its use is disadvantageous, as it causes resistance from mosquitoes, attacks on non-target organisms and contamination of the water flow [1-3]. Therefore, it is necessary to search for other larvicides that are effective and less dangerous to man and the environment.

Within this perspective, we highlight larvicides based on extracts or oils distilled from plants. Previous studies have shown the larvicidal activity of some plants [4-9], due to high biodegradability, low toxicity to mammals [10, 11], impediment of ovoposition, inhibition, growth and reproduction against mosquito species [12, 13] and in some cases with greater durability than synthetic products [14, 15]. Generally, the biological activity of a plant is attributed to the component in greater quantity, in which case limonene is highlighted.

Citric compounds, for the most part, consist of limonene [16]. Previous studies show that this compound alone or as a major constituent in plants has larvicidal activity against *Aedes aegypti* [6, 7, 17]. Among citrus species with high limonene content, we highlight *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In the literature, there are reports that the oil distilled from this plant has molluscicidal [18], antifungal [19], antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activity [20].

Therefore, in view of the above, in this study we will determine the chemical composition and larvicidal activity of the oil distilled from the husks of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and the pattern of the major constituent against *Aedes aegypti*.

## MATERIAL AND METHODS

### Obtaining and distilling essential oil

Sample collection took place similarly to the study by Gomes *et al.* [18], however with some modifications. We collected the samples (fruits), branches and leaves of the plant species *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on the campus of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão (IFMA) - Maracanã, located at Avenida dos Curiós, S / N°, Vila Esperança, whose exsiccates presented identification number 01484 at “Herbário Ático Seabra” of the Universidade Federal do Maranhão.

To distill the essential oil, we used a Clevenger glass extractor that was attached to the 6000 mL round bottom flask connected to the electric blanket as a heat source. In each extraction routine, weigh and crush in an electric mill 300 g of the sample. After this step, we mix with 1:10 distilled water and place it in a round bottom flask connected to the extractor system. Then we turn on the electric blanket at a temperature of 100 °C. After 5 h, the distillation was extinguished by collecting the essential oil. This was dried by percolating over anhydrous sodium sulfate. These operations were performed in triplicates and the samples stored in amber glass ampoules under refrigeration to avoid possible losses of volatile constituents. For density determination, we used a pycnometer, while the yield was calculated from the volume of oil obtained and the base of the moisture-free material (B.L.U).

### **Chromatographic analysis GC/MS**

We identified the constituents of the essential oil by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) equipped with the same configurations as the study by Gomes *et al.* [18]. The volatile constituents were observed in a Shimadzu gas chromatograph, coupled to a GC-MS mass spectrometer QP5050A, equipped with a BPX 5% phenylpolysiloxane-siloxane capillary column, (30 m length x 0.25 mm thick and 0.25 µm of film thickness), using helium as carrier gas. The temperature of the injector and GC interface with selective detector was maintained at 280 °C in flow in the 2.7 mL·min<sup>-1</sup> column, programmed to operate at 50 °C. For analysis, we inject aliquots with a volume of 1 mL in ethyl acetate. The components of the oil were identified by comparing these with data obtained from authentic substances existing in reference libraries.

### **Obtaining and cultivating *Aedes aegypti* larvae**

We carried out the collection and cultivation of *Aedes aegypti* larvae according to the methodology proposed by Gomes *et al.* (2019) [6]. We collected the eggs at the Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga in São Luís Maranhão, through three black polyethylene buckets, with a capacity of 500 mL each, where we put water and insert two eucatex straws for the mosquito oviposition. We inspect the traps weekly to replace the reeds and collect the eggs. After this stage, we put the *Aedes aegypti* eggs to hatch at a temperature of 31 °C in a 200 mL polyethylene container with mineral water. We fed the larvae with cat food until they reached the third stage, when the experiments were carried out.

### **Test of larvicidal activity**

For the larvicidal test, we performed it according to the methodology proposed by Gomes and collaborators with some modifications [6]. Initially, we prepared

a 1.00 mg·L<sup>-1</sup> stock solution by weighing 50 mg of the oil into a solution consisting of 49.75 mL of distilled water and 0.25 mL of Tween-80. From there, we prepare solutions in concentrations from 70 to 150 mg·L<sup>-1</sup>. We used ten larvae for each concentration and 30 mL of each solution at the concentrations mentioned. We performed all tests in triplicate and as a negative control we used a solution formed by 49.75 mL of water to 0.25 mL of Tween-80, and as a positive control, a solution of temephos (4-({4- [(dimethoxyphosphorothioyl) oxy] phenyl} thio) phenyl dimethyl phosphate) to 100 mg·L<sup>-1</sup>, equivalent to the concentration used by the Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) for the larvicidal control of the vector. In an analogous way, we prepare the solutions for the standard of the major constituent, identified in the chromatographic analysis.

### Statistical analysis

In this manner we performed the statistical analysis according to the methodology proposed by Gomes *et al.* [9, 21], using the Reed-Muench method. This method assumes that an animal may die or survive, respectively, a dose higher or lower than those stipulated. Basically, starting from a table with mortalities in the tested concentration, we constructed a graph of the percentage mortality according to the logarithm of the tested concentration, in which the intersection of the curves of live and dead accumulates shows the Lethal Concentration at 50% (LC<sub>50</sub>) [22, 23].

To calculate the confidence interval, we use the Pizzi method [24], according to formula  $2 \cdot 10^{SE}$ , where the standard error (SE) is calculated from the formula  $(SE^2 = 0.79 \cdot h \cdot R / 20)$ , where R and h are determined, respectively, from the difference between the log of the dose that kills 75% and the log of the dose that kills 25% of the larvae and the average of the differences in the log values of the doses.

### Performance and chromatographic analysis of essential oil

To determine the composition, distill the oil by hydrodistillation and identify the components by gas chromatography coupled to the mass spectrometer. The distillation result revealed an average yield and average density, respectively of 2.47% (m/m) and 0.850 g×mL<sup>-1</sup>, while the chromatographic analysis showed us the presence of 15 compounds in which the largest were, respectively, limonene, linalool and β-Myrcene.

### Larvicidal Activity

We investigated larvicidal activity by submitting ten larvae to concentrations of 70 to 150 µg·mL<sup>-1</sup> for essential oil and 70 to 160 µg·mL<sup>-1</sup> for the main component pattern identified in the GC / MS analysis over a 24 h period. Then, we performed the calculation for 50% lethal concentration (LC<sub>50</sub>) from the intersection of the accumulated

dead and alive curves by the Reed-Muench method and the confidence interval by the Pizzi method. From this analysis, we observed that the essential oil distilled from the shells of *C. sinensis* (L.) Osbeck (table 2 and figure 1) and the limonene pattern (table 3 and figure 2) showed larvicidal activity with 100% mortality, respectively, in the concentration 150 and 160  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and  $\text{LC}_{50}$  and confidence interval, respectively, 99.01 ( $\pm 2.10$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 126.03 ( $\pm 2.09$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As shown in the  $\text{LC}_{50}$  values, we observed that the oil has a higher lethality than the standard.

**Table 1.** Identification of compounds in the essential oil sample from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

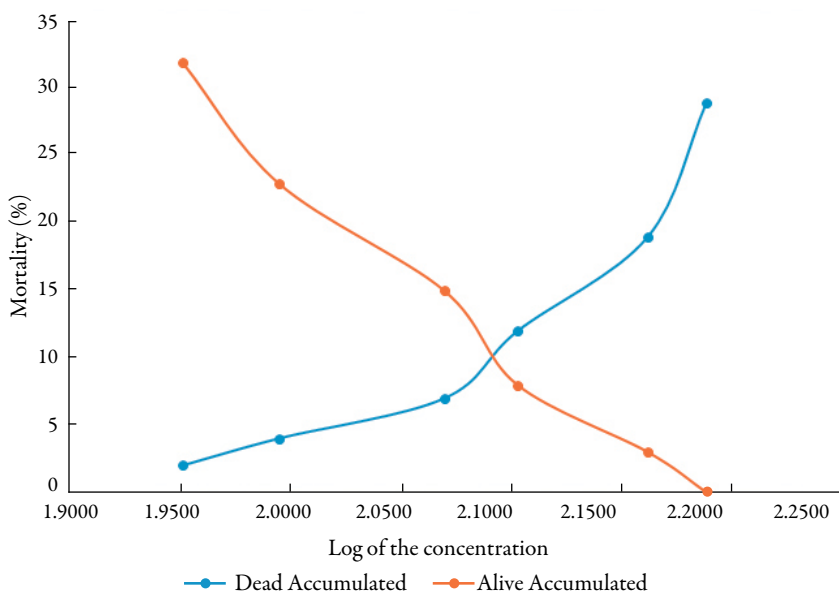
Retention Time	Compounds	Percentage (%)
5155	$\alpha$ -Pinene	0.33
6350	$\beta$ -Myrcene	1.90
6861	Octanal	0.93
7610	Limonene	89.55
8287	1-Octanol	0.46
8919	Linalool	5.36
8959	Nonanal	0.08
9866	Citronelal	0.06
10523	Terpineol	0.12
10873	$\alpha$ -Terpineol	0.39
10926	Decanal	0.25
11352	$\beta$ -Citronelol	0.08
11643	Neral	0.13
12210	Citral	0.17
12496	Hexane cycle	0.20

**Table 2.** Mortality of larvicidal activity of the essential oil.

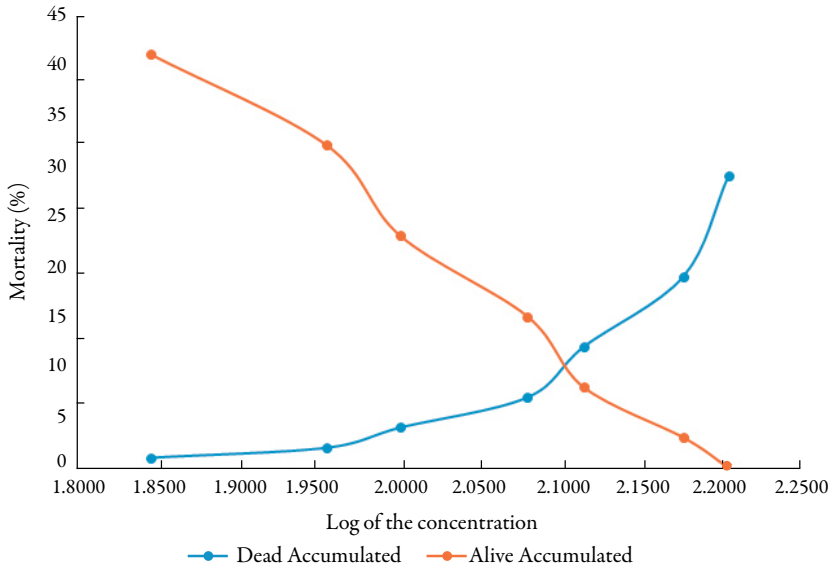
Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Log of the concentration	Dead	Alive	Dead accumulated	Alive accumulated	Mortality (%)
150	2.1760	10	0	36	0	100
130	2.1139	8	2	26	2	80
120	2.0791	7	3	18	5	70
100	2.0000	5	5	11	10	50
90	1.9542	4	6	6	16	40
70	1.8450	2	8	2	24	20

**Table 3.** Mortality of the larvicidal activity of the limonene pattern.

Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Log of the concentration	Dead	Alive	Dead accumulated	Alive accumulated	Mortality (%)
160	2.2040	10	0	29	0	100
150	2.1760	7	3	19	3	70
130	2.1139	5	5	12	8	50
120	2.0791	3	7	7	15	30
100	2.0000	2	8	4	23	20
90	1.9542	1	9	2	32	10
70	1.8450	1	9	1	41	10



**Figure 1.** Estimate of the  $CL_{50}$  of the essential oil shells distillate of the *C. sinensis* (L) Osbeck through the method Reed-Muench.



**Figure 2.** Estimate of the  $CL_{50}$  of the limonene pattern through the method Reed-Muench.

## DISCUSSION

Combating the larvae of the vector mosquito *Aedes aegypti* with chemical insecticides is the most effective way to prevent the spread of diseases. However, previous studies show that the use of these caused resistance in the mosquito population and reached non-target organisms, which, in some way, encouraged researchers to seek alternatives that impact less the environment and are more effective from plant-based insecticides. Here, we show that the essential oil distilled from the husks of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck consists mostly of limonene and showed greater larvicidal activity against *Aedes aegypti* than the limonene standard. Therefore, distilled oil has the potential to replace the use of chemical larvicides.

In the first found, from the chromatographic analysis coupled to the mass spectrometer of the oil distilled from the shells *C. sinensis* (L.) Osbeck we identified 15 compounds in which limonene was present in greater quantity. The result of our study differs somewhat from previous studies, as in these the percentage of limonene ranged from 71.3 to 98% [18, 25-27]. Generally, we attribute this difference to the interference of some factors such as: seasonality, temperature, collection period, intensity of solar radiation, age, and development of plants, among others [28, 29].

In the second found, we confirmed the larvicidal activity of the oil by comparing the result of ours with a study with the criterion established by Cheng *et al.* (2003). According to these authors, a compound shows activity when the  $LC_{50}$  is less than  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [30]. Taking this criterion into consideration, we observed that the standard was considered ineffective, as it exceeded the limit value. However, the results obtained in this study are in line with previous studies, in which they state that essential oils are more effective than the standard of the major component [31].

So, the evidence that the oil distilled from the shells of *C. sinensis* (L.) Osbeck showed larvicidal activity came from the observation of the main component identified in this study, limonene. Previous studies with other citrus species, whose limonene was the major constituent, showed larvicidal activity with  $LC_{50}$ , ranging from 15.48 to 37.03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [6,17]. However, the results obtained in this study differ from previous studies [17, 26, 27], in which the values obtained from the  $LC_{50}$  for distilled oil *C. sinensis* (L.) Osbeck ranged from 11.92 to 538  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Although most of these studies do not present exactly the periods of the activity evaluation and due to the difference of seasons on the terrestrial globe in different hemispheres, we explain these differences from the seasonal variation, as previous studies have shown that larvicidal activity is greater in seasons spring and autumn when compared with summer and winter [32,33].

Despite the good results obtained in this study, we recommend for later studies the evaluation of the larvicidal activity of the other components of the oil in order to verify the influence of synergism.

However, a larvicidal activity described in our study just has shown the potential of the oil distilled from the shells of the *C. sinensis* (L.) Osbeck to replace chemical larvicides. However, further studies are needed to certify its safety for the environment and for man.

## CONCLUSION

To sum up, the essential oil shells distillate of the *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by hydro-distillation is formed in its most part by limonene. Furthermore, the essential oil represented a larvicidal activity moderated against the *Aedes aegypti* and greater than the limonene standard, which makes it a potential substitute for synthetic larvicides.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank CAPES for granting the scholarship and all of the Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão for the help given during the execution of this researching.



## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## REFERENCES

1. L.P. de G. Cavalcanti, R.J.S. Pontes, A.C.F. Regazzi, F.J. de Paula Júnior, R.L. Frutuoso, E.P. Sousa, F.F. Dantas Filho, J.W. de O. Lima, Efficacy of fish as predators of *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions, *Rev. Saude Publica*, **41**, 638-644 (2007).
2. M. Govindarajan, G. Benelli,  $\alpha$ -Humulene and  $\beta$ -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), *Parasitol. Res.*, **115**, 2771-2778 (2016).
3. A. Muhammetoglu, S. Durmaz, B. Uslu, Evaluation of the environmental impact of pesticides by application of three risk indicators, *Environment. Forensics*, **11**, 179-186 (2010).
4. D.G. da Rocha-Voris, L. dos Santos-Dias, J.A. Lima, K. dos S.C. Lima, J.B.P. Lima, A.L. dos Santos-Lima, Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houltt. against Zika virus vectors, *Environment. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 22541-22551 (2018).
5. P.R.B. Gomes, R.W.S. de Oliveira, V.E. Mouchrek Filho, A.A. do Nascimento, A.P. Everton, H.C. Louzeiro, J.B. Reis, M.A. Fontenele, Activity larvicide of the essential oil *Syzygium aromaticum* (carnival-of-india) in front of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Periodico Tche Quimica*, **15**, 184-195 (2018).
6. P.R.B. Gomes, M.B. Oliveira, D.A. de Sousa, J.C. da Silva, R.P. Fernandes, H.C. Louzeiro, R.W.S. de Oliveira, M. do L. de Paula, V.E. Mouchrek Filho, M.A. Fontenele, Larvicidal activity, molluscicide and toxicity of the essential oil of *Citrus limon* peels against, respectively, *Aedes aegypti*, *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*, *Eclét. Quím. J.*, **44**, 85-95 (2019).
7. P.R.B. Gomes, D.A. de Sousa, G.O. Everton, M.A. Fontenele, J.N.L. e Marques, A.C. de Freitas, V.K.L. Hunaldo, H.C. Louzeiro, M. do L. de Paula, J.B. Reis, Chemical composition and larvicidal activity of *Citrus limonia* Osbeck bark essential oil, *J. Med. Plants Res.*, **14**, 354-358 (2020).

8. P.R.B. Gomes, D.P. Santos, V.E.M. Filho, L.S. dos S. Mendes, M.A. Fontenele, Activity larvicide of the essential oil of *Cinnamomum Zeylanicum* Blume, *Periodico Tche Quimica*, **16**, 18-26 (2019).
9. P.R.B. Gomes, A.L.S. Silva, H.A. Pinheiro, L.L. Carvalho, H.S. Lima, E.F. Silva, R.P. Silva, C.H. Louzeiro, M.B. Oliveira, V.E.M. Filho, Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*, *Rev. Bras. Plant. Med.*, **18**, 597-604 (2016).
10. G. Koliopoulos, D. Pitarokili, E. Kioulos, A. Michaelakis, O. Tzakou, Chemical composition and larvicidal evaluation of Mentha, Salvia, and Melissa essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*, *Parasitol. Res.*, **107**, 327-335 (2010).
11. R.M. Gleiser, M.A. Bonino, J.A. Zygadlo, Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Parasitol. Res.*, **108**, 69-78 (2011).
12. S. Rajkumar, A. Jebanesan, Repellency of volatile oils from *Moschosma polystachyum* and *Solanum xanthocarpum* against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say., *Trop. Biomed.*, **22**, 139-142 (2005).
13. T. Pushpanathan, A. Jebanesan, M. Govindarajan, Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)(Diptera: Culicidae), *Trop. Biomed.*, **23**, 208-212 (2006).
14. S.J. Moore, A. Lenglet, N. Hill, Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez province, the Bolivian Amazon., *J. Am. Mosquito Control Assoc.*, **18**, 107-110 (2002).
15. M.O. Omolo, D. Okinyo, I. O. Ndiege, W. Lwande, A. Hassanali, Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*, *Phytochemistry*, **65**, 2797-2802 (2004).
16. M.S. Ladaniya, *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*, Academic Press, San Diego (CA), 2008, p. 13-65.
17. A. Giatropoulos, D.P. Papachristos, A. Kimbaris, G. Koliopoulos, M.G. Polisiou, N. Emmanouel, A. Michaelakis, Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution, *Parasitol. Res.*, **111**, 2253-2263 (2012).

18. P.R.B. Gomes, J. de D. da Costa-Leite, D.A. de Sousa, G.O. Everton, J.B. Reis, H.C. Louzeiro, M. A. Fontenele, M. do L. de Paula, A.C. de Freitas, V.K.L. Hunaldo, Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**, 28-43 (2020).
19. N. Sharma, A. Tripathi, Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem, *Microbiol. Res.*, **163**, 337-344 (2008).
20. P. Singh, R. Shukla, B. Prakash, A. Kumar, S. Singh, P.K. Mishra, N.K. Dubey, Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene, *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1734-1740 (2010).
21. P.R.B. Gomes, J.B. Reis, J.C. da Silva, R.W.S. de Oliveira, M. do L. de Paula, H.C. Louzeiro, V. E. Moucherek Filho, M.A. Fontenele, Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**, 122-127 (2019).
22. S.M. Colegate, R.J. Molyneux, *Bioactive Natural Products*, CRC Press, Boca Raton (FL), 2007, p. 10-18.
23. L.J. Reed, H. Muench, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Epidemiol.*, **27**, 493-497 (1938).
24. M. Pizzi, Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method, *Hum. Biol.*, **22**, 151-190 (1950).
25. S.S. Vera, D.F. Zambrano, S.C. Méndez-Sanchez, F. Rodríguez-Sanabria, E.E. Stashenko, J. E. D. Luna, Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Parasitol. Res.*, **113**, 2647-2654 (2014).
26. A.F. de O. Araujo, J.T. Ribeiro-Paes, J.T. de Deus, S.C. de H. Cavalcanti, R. de S. Nunes, P.B. Alves, M. de L. da G. Macoris, Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **111**, 443-449 (2016).
27. E.S.B. Cavalcanti, S.M. de Moraes, M.A.A. Lima, E.W.P. Santana, Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L., *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 541-544 (2004).

28. L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes, Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quím. Nova*, **30**, 374-381 (2007).
29. P.T. Silva, H.S. Santos, A.M.R. Teixeira, P.N. Bandeira, C.L. Holanda, J.P.C. Vale, E.J.P. Pereira, J. Menezes, T.H.S. Rodrigues, E.B. Souza, Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer, *South African J. Botany*, **124**, 329-332 (2019).
30. S. Cheng, Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae, *Bioresource Technol.*, **89**, 99-102 (2003).
31. C.N. Dias, D.F.C. Moraes, Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review, *Parasitol. Res.*, **113**, 565-592 (2014).
32. C.M.M. Fernandez, E.L. Barba, A.C.M. Fernandez, B.K. Cardoso, I.B. Borges, O.S. Takemura, L. de A. Martins, L.E.R. Cortez, D.A.G. Cortez, Z.C. Gazim, Larvicidal activity of essential oil from *Tetradenia riparia* to control of *Aedes aegypti* larvae in function of season variation, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **17**, 813-823 (2014).
33. C.M.M. Fernandez, M. F. da Rosa, A.C.A.M. Fernandez, F.B. Lorenzetti, K.F. Raimundo, D.A. G. Cortez, J.E. Gonçalves, M.R. Simões, N.B. Colauto, V. da S. Lobo, Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Laurus nobilis* leaves obtained at different seasons, *J. Essent. Oil Res.*, **30**, 379-387 (2018).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

P.R. Barros-Gomes, G.V. de Assunção, G. Oliveira-Everton, H. Souza de Lima, J.R. Fernandes de Araújo, E. Fonseca-Silva, A. Vasconcelos-Melo, H. Costa-Louzeiro, J. Batista-Reis, V.E. Mouchrek Filho, Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 48-60 (2021).

## Luliconazole: Stability-indicating LC method, structural elucidation of major degradation product by HRMS and *in silico* studies

Douglas dos Santos Porto<sup>1\*</sup>, Lisiane Bajerski<sup>1</sup>, Marcelo Donadel Malesuik<sup>1,2</sup>, Juliano Braun Azeredo<sup>2</sup>, Fávoro Reisdorfer Paula<sup>1,2</sup>, Clésio Soldateli Paim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Desenvolvimento e Controle de Qualidade. Curso de Farmácia. Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Campus Uruguaiana-RS), BR 472 Km 585, CEP 97500-970, Uruguaiana (RS), Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas. Curso de Farmácia. Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Campus Uruguaiana-RS), BR 472 Km 585, CEP 97500-970, Uruguaiana (RS), Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 55 99959 9010

\* E-mail address: douglasprt@hotmail.com (Douglas dos Santos Porto)

Received: 6 August 2020

Revised: 9 October 2020

Accepted: 12 October 2020

### SUMMARY

**Aim:** A new stability-indicating liquid chromatography method was developed and validated for the quantitative determination of luliconazole. **Materials and methods:** Preliminary forced degradation study demonstrated an additional peak of the degradation product at the same retention time to the drug, due to this, the method was developed optimizing the chromatographic conditions to provide sufficient peak resolution ( $R \geq 2$ ). The experimental design was evaluated to assess the robustness and the best chromatographic conditions to be used for the validation. **Methodology:** Luliconazole solutions were exposed to various stress conditions to evaluate the method indication stability, in which the degradation product (DP-1) formed was isolated, identified, and evaluated *in silico* to predict degradation pathway and toxicity. The procedure was validated by robustness, selectivity, linearity, precision, and accuracy. Liquid chromatography was performed in a Phenomenex® RP-18 column with a mixture of acetonitrile and 0.3% (*v/v*) triethylamine solution as a mobile phase in isocratic elution. **Results and conclusions:** The method demonstrated robustness, good recovery, precision, linear response over a range from 5.0 to 40.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and to be stability indicating. The alkaline stress condition resulted in the formation of DP-1. HRMS studies identified this product as an hydroxyacetamide derivative, and *in silico* studies did not show toxic potential.

*Keywords:* Luliconazole, stability-indicating method, forced degradation, degradation product, *in silico* study, Zeneth® software.

## RESUMEN

### Luliconazol: método por LC indicativo de estabilidad, elucidación estructural del producto de degradación mayoritario por HRMS y estudios *in silico*

**Objetivo:** un nuevo método indicativo de estabilidad por cromatografía líquida fue desarrollado y validado para la determinación cuantitativa de luliconazol. **Materiales y métodos:** estudios preliminares de degradación forzada demostraron un pico adicional en el mismo tiempo de retención del fármaco. El método desarrollado para optimizar las condiciones cromatográficas proporcionó una adecuada resolución ( $R \geq 2$ ). El diseño experimental fue evaluado para verificar su robustez y la mejor condición cromatográfica para validación. **Metodología:** las soluciones de luliconazol fueron expuestas a diferentes condiciones de estrés para evaluar la indicación de estabilidad del método, el aislamiento del producto de degradación formado (DP-1), su identificación y análisis *in silico* para predecir su ruta de degradación y toxicidad. El procedimiento se validó por robustez, selectividad, linealidad, precisión y exactitud. Las condiciones cromatográficas incluyeron una columna Phenomenex® RP-18, como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y solución 0,3% (*v/v*) de trietilamina en elución isocrática. **Resultados y conclusiones:** el método mostró ser robusto, con buena recuperación, precisión, respuesta lineal en el rango de 5,0 a 40,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e indicativo de la estabilidad. La condición de estrés alcalina resultó en la formación de DP-1. Estudios por HRMS identificaron este producto como un derivado hidroxiacetamida y los estudios *in silico* no mostraron potencial de toxicidad.

*Palabras clave:* Luliconazol, método indicativo de la estabilidad, degradación forzada, producto de degradación, estudios *in silico*, Zeneth® software.

## RESUMO

### Luliconazol: método LC indicativo de estabilidade, elucidação estrutural do principal produto de degradação por HRMS e estudos *in silico*

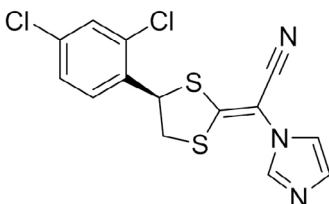
**Objetivo:** um novo método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa de luliconazol. **Materiais e métodos:** estudos preliminares de degradação forçada demonstraram um

pico adicional no mesmo tempo de retenção do medicamento. O método desenvolvido para otimizar as condições cromatográficas proporcionou resolução adequada ( $R \geq 2$ ). O delineamento experimental foi avaliado para verificar sua robustez e a melhor condição cromatográfica para validação. **Metodologia:** soluções de luliconazol foram expostas a diferentes condições de estresse para avaliar a indicação da estabilidade do método, o isolamento do produto de degradação formado (DP-1), sua identificação e análise *in silico* para predizer sua rota de degradação e toxicidade. O procedimento foi validado quanto à robustez, seletividade, linearidade, precisão e exatidão. As condições cromatográficas incluíram uma coluna Phenomenex® RP-18, como fase móvel uma mistura de acetonitrila e solução de trietilamina 0,3% (v/v) em eluição isocrática. **Resultados e conclusões:** o método mostrou-se robusto, com boa recuperação, precisão, resposta linear na faixa de 5,0 a 40,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e indicativo de estabilidade. A condição de estresse alcalino resultou na formação de DP-1. Os estudos da HRMS identificaram este produto como um derivado da hidroxiacetamida e os estudos *in silico* não mostraram nenhum potencial de toxicidade.

*Palavras-chave:* Luliconazol, método indicativo de estabilidade, degradação forçada, produto de degradação, estudos *in silico*, software Zeneth®.

## INTRODUCTION

Luliconazole (figure 1), chemically  $(-)-(E)$ -[4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dithiolan-2-ylidene]-1-imidazolylacetonitrile, is a broad-spectrum antifungal developed by Nihon Nohyaku Co Ltd (Osaka, Japan) [1] and it is commercially available as cream 1% (*w/w*). The drug belongs to the azole class, used to treat fungal infections. The azole class has a mechanism of action toward the inhibition of ergosterol, which is the major sterol present in the fungal cell wall, by inhibiting enzymes that are important to your synthesis, such as sterol 14 $\alpha$ -demethylase [2-4].



**Figure 1.** Molecular structure of luliconazole.

The indications for the use of this drug are for the treatment of superficial fungal infections caused by *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Epidermophy-*

*ton floccosum*. Furthermore, luliconazole is also effective against *Candida* spp. [4-6]. The drug was extremely effective against the diseases caused by these microorganisms, improving the clinical status of patients [7, 8].

Analytical stability-indicating methods are important for evaluating drug stability in pharmaceutical form during drug development. These are essential for the product to reach the patient with quality, safety and suitable effectiveness, knowing their respective susceptibility under various stress conditions [9, 10]. The low stability of the active ingredient, associated with some environmental factors, such as heat and light, can affect the effectiveness of the drug, as well as chemical reactions, leading to the formation of degradation products, so there is a need to know the stability of the molecule. The identification of degradation product, caused by some of these factors, is also important as the safety of a drug which can produce toxic pharmacological effects [9, 11].

Software and other computational tools have been of great help for scientific research. In the field of stability study, they are mainly used as a complement to forced degradation studies. *In silico* predictions are used to predict likely degradation products of active pharmaceutical ingredient (API), their respective degradation pathways, and also to evaluate alert for genotoxicity [12-14].

Zeneth® software, developed by Lhasam Limited (Leeds, UK), is a most sophisticated program to predict *in silico* degradation pathways of API under some conditions assisting the elucidation of a probable degradation product [15]. The program is described as an expert system capable of making decisions based on experimental precedence or knowledge base [16]. This software can predict the degradation under various temperatures, pH, light conditions, and also dimerization reaction and interaction with excipients [17-19].

There are some studies in the literature describing the determination of luliconazole in rat plasma by UPLC-MSMS [20], UV spectrophotometric method [21-23], thin-layer chromatography (TLC) [24] and a few works describing quantitative determination and luliconazole stability studies in pharmaceutical formulations by LC [25-27].

However, no studies have been found in the literature describing the validation method, isolation, and identification of the main degradation products by high-resolution mass spectrometry (HRMS). Due to this, the objective of this study is to develop and validate a new stability-indicating analytical method for quantification of luliconazole, identification of molecular mass of the degradation product (DP -1) by alkaline hydrolysis and *in silico* analysis to suggest and evaluate the chemical structure and the theoretical toxicity, using Zeneth® 7 and OSIRIS Property Explorer, respectively.



## MATERIALS AND METHODS

### Apparatus

A Shimadzu Prominence® liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AD quaternary pump, SIL-20AC HT autosampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A photodiode-array detector and LC Solution V. 1.24 SP1 manager system software was used. Photodegradation studies were carried out in a photostability UV chamber (1.0 x 0.17 x 0.17 m) with mirrors and equipped with UV-C lamp (Ecolume ZW®, 254 nm, 30 W). A Hanna® pH/mV meter was used to pH determination. The mass spectrometer used was a Photo Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (APPI-QTOF MS) controlled by the Compass 1.3 for micrOTOF software package (Bruker Daltonics).

### Chemicals and standard

The luliconazole chemical reference standard (CRS) was acquired by Toronto Research Corporation (Ontario, Canada). All chemicals used were of analytical grade, and all solvents were of LC grade. Methanol and acetonitrile were purchased from Avantor® (J.T.BAKER, Center Valley, PA, USA). Phosphoric acid and triethylamine were purchased from Merck® (Darmstadt, Germany) and sodium phosphate from Dinâmica® (Diadema, Brazil). The solvents used (chloric acid, formic acid, and sodium hydroxide) were of purity grade and purchased from Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany). Hydrogen peroxide was obtained from Supelco® (Bellefonte, PA, USA). Ultra-pure water obtained from the equipment Milli-Q® (Millipore, Bedford, USA).

### Chromatographic conditions

The chromatographic separation was performed on a Phenomenex® RP-18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm). The elution was performed by isocratic elution with a mobile phase mixture of acetonitrile and 0.3% triethylamine solution adjusted to pH 3.3 with 20% (*v/v*) formic acid (60:40 *v/v*) at a flow-rate of 1.1 mL.min<sup>-1</sup>. The mobile phase was filtered using 0.45 µm filter and sonicated for 15 minutes by ultrasonic vibrations before use. The injection volume was 20 µL and the run time 15 min. The column oven was set at 55 °C and the luliconazole was determined by UV detection at 296 nm using photodiode-array.

### Preparation of reference standard and sample solution

The CRS and sample solution were prepared by weighing 5.0 mg of luliconazole and dissolving with methanol in a 50 mL volumetric flask to get the concentration of 100 µg.mL<sup>-1</sup>. An aliquot of 2.0 mL of this solution was transferred to a 10 mL volumetric flask and completed with methanol to obtain a final concentration of 20 µg.mL<sup>-1</sup>. All the solutions were filtered with a 0.45 µm membrane filter.

## Method validation

The developed chromatographic method was validated according to the Official Guidelines [28]. The validation was evaluating the following analytic parameters: robustness, selectivity, linearity, precision, and accuracy. The stability-indicating capability was determined by forced degradation conditions.

### *Robustness*

The robustness of the method was determined by analyzing the nominal sample and the sample subjected to UV-C radiation with different conditions such as pH of aqueous phase ( $3.0 \pm 0.3$ ), percentage of acetonitrile ( $62.5 \pm 2.5$  %), temperature ( $50 \pm 5.0$  °C), flow rate ( $1.0 \pm 0.1$  mL.min<sup>-1</sup>) wavelength of detection ( $296 \pm 3$  nm) and the different supplier column (Shim-pack® and Phenomenex®). The six factors selected were examined in a Plackett-Burman design (N=12) and the effect (E) of each factor and the estimated experimental error (SE)<sub>e</sub> were calculated [29]. Statistical analysis allows defining a numerical limit value capable of defining what is significant and what is not. This limit value is derived from the *t*-test statistical method, according to the equation:

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e}$$

An effect is considered significant at a given  $\alpha$  level if *t* calculated > *t* critical.

### *Selectivity*

Stress conditions were performed to provide an indication of the stability-indication and the selectivity properties of the method. The solution stock of luliconazole was submitted to hydrolytic, oxidative, thermal, and photolytic conditions. The peak purity test was performed by photodiode array detector (PDA).

*a) Acid hydrolysis:* This condition was performed maintained 2.0 mL of stock solution of luliconazole ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) at two different concentrations of HCl ( $0.1$  and  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) for 1 h and stored at room temperature. Subsequently, the solution was neutralized by adding  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  and  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  NaOH, respectively and diluting with methanol to a final concentration of  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . The same procedure described above was performed in water bath at  $70$  °C for 1 h.

*c) Alkaline hydrolysis:* This condition was performed maintained 2.0 mL of stock solution of luliconazole ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) at two different concentrations of NaOH ( $0.1$  and  $0.01 \text{ mol.L}^{-1}$ ) for 1 h and stored at room temperature. Subsequently, the solution was neutralized by adding  $0.1$  and  $0.01 \text{ mol.L}^{-1}$  HCl, respectively and diluting with methanol to a final concentration of  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

*d) Thermal degradation:* This condition was performed by adding 2.0 mL of stock solution of luliconazole ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in 2.0 mL of methanol and maintained 2 h s in a water bath at  $70^\circ\text{C}$ . After that, the solution was diluted with methanol to a final concentration of  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

*e) Oxidative degradation:* This condition was performed maintained 2.0 mL of stock solution of luliconazole ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% for 1 h and stored at room temperature. Thereafter, the solution was diluted with methanol to a final concentration of  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The same procedure described above was performed in water bath at  $70^\circ\text{C}$  for 1 h with  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% and  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.

*f) Photolytic degradation:* This condition was performed by adding 1.0 mL of stock solution of luliconazole ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in Plastibrand® disposable cuvettes and subjected to UV-C radiation for 0.25 h and 0.5 h in the photostability chamber. Thereafter, all the solutions were diluted with methanol to a final concentration of  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### *Linearity*

The calibration curve was prepared with seven concentrations (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 and  $40.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of luliconazole CRS, which were prepared and injected in triplicate. The results were plotted in graphic with peaks of the chromatographic against the respective concentrations to obtain the analytical curve. The calculation of the regression line was employed by using the method of least squares and the curves were validated through analysis of variance.

### *Precision*

The precision was in two different days (intra-day and inter-day) by analyzing six sample solutions of luliconazole prepared at  $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The precision was expressed as a percentage of relative standard deviation (%RSD).

### *Accuracy*

The accuracy was determined by percentage recovery by adding aliquots of 0.4, 1.0 and 2.0 mL of the solution standard to sample solution of  $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , corresponding 20, 50, and 100% of the nominal concentration.

### **System suitability limits**

The SSL were established to ensure the validity of the analytical procedure. During the validation, the sample solution was exposed to UV radiation for 0.25 h. Theoretical plates, retention factor, tailing factor, resolution between the luliconazole and its photodegradation product were the parameters evaluated.

### Isolation and identification of the degradation product

Luliconazole was subjected to forced degradation under an alkaline stress condition using 0.01 mol.L<sup>-1</sup> NaOH for 1 h at room temperature, as described in the *selectivity* studies. The degradation product was named DP-1 according to the number of products present in the HPLC analysis. The isolation of DP-1 was performed at the same chromatographic conditions used for the method validation. Analysis performed by HRMS was used for the identification of DP-1 molecular ion (*m/z*).

The mass spectrometer used was a photo ionization time of flight mass spectrometry (APPI-QTOF MS) controlled by the Compass 1.3 for micrOTOF software package (Bruker Daltonics) and operated in positive ion mode. The capillary voltage was maintained at +1500 V and +1000 V to luliconazole and DP-1, respectively, with the end plate offset at -500 V to both molecules. The pressure for the nebulizer gas (N<sub>2</sub>) was set at 1.5 bar, and the drying gas (N<sub>2</sub>) flow-rate was 2.0 L.min<sup>-1</sup> with a temperature of 200 °C. The full scan mass ranged from *m/z* 50 to 3000. The data were analyzed using Bruker Compass Data Analysis Software (version 4.2; Bruker Daltonics).

The Zeneth<sup>®</sup> 7 software was used to predict the structure of the degradation product. The luliconazole structure was drawn in the software and submitted under hydrolysis condition at pH 10.0 to predict the degradation products generated and their degradation pathways.

### *In silico* prediction toxicity

To evaluate the theoretical toxicity risk of the suggested DP-1 two *in silico* toxicity programs were employed. The potential mutagenic, tumorigenic, irritant, and toxicant reproductive system effect was performed by OSIRIS Property Explorer<sup>®</sup> free web software and to assess genotoxicity (AMES toxicity), hepatotoxicity and skin sensitization was used the pkCSM free web software [30, 31]. The results were compared to *in silico* toxicity to luliconazole as control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as toxic positive.

## RESULTS AND DISCUSSION

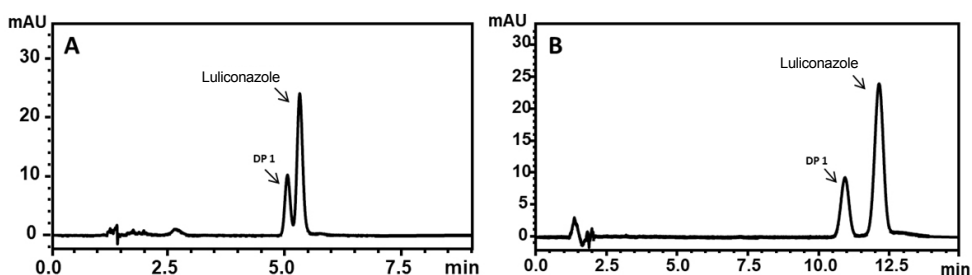
### Development of analytical method

During preliminary degradation studies under photolytic conditions was verified the formation of a degradation product with similar retention time to luliconazole (figure 2A). The resolution between these peaks was 1.095, which is not recommended according to the literature [32, 33]. Due to this, the method was developed optimizing the chromatographic conditions in order to provide sufficient separation

between luliconazole and its photodegradation product, such as aqueous phase with and without triethylamine, at different pH values, and also the addition of phosphate buffers. The use of triethylamine as aqueous component resulted in better peak symmetry. The organic phase (acetonitrile) ration was changed until the complete separation. The oven temperature was also tested.

At first, the tested temperatures (35, 40 and 45 °C) did not show significant differences in the separation of the peaks, however, the drug peak and the degradation product peak had a better resolution when the temperature was set at 50 °C (supplementary figure S1). The use of 0.3% (*v/v*) pH 3.0 triethylamine solution improved the peak symmetry and lowered the retention time compared to the other pH values tested (4.0, 5.0, 6.0 and 6.5). The peaks were separated with an adequate resolution ( $R = 2.01$ ) with a simple mobile phase composed of 0.3% triethylamine solution (pH 3.0 adjusted with 20% formic acid *v/v*) and acetonitrile (62.5:37.5 *v/v*) at the 50 °C (figure 2B). It was tried to reduce the retention time of the drug allowing for a rapid analysis and determination of luliconazole, however, an acceptable resolution and results of peak parameters was achieved with retention time at approximately 12.1 min. After suitable separation, the experimental design of Plackett-Burman was carried out to evaluate the robustness of the chromatographic method to obtain the best chromatographic condition to be used in this study. Therefore, based on the experiments, the proportion of the aqueous phase and organic phase and the oven temperature was changed to provide the best condition.

Other studies available in the literature did not present complete methodologies for forced degradation tests, according to ICH guidelines [25, 27]. Sonawane *et al.* [26] validated a stability-indicating method to quantify luliconazole. However, it does not present data confirming the complete resolution between the drug luliconazole and its main photo degradation product.



**Figure 2.** Chromatograms obtained from luliconazole and photodegradation product. Chromatogram A: Mobile phase composed by a mixture of acetonitrile and 0.3% (*v/v*) triethylamine solution pH 3.0 (74:26 *v/v*). Chromatogram B: (62.5:37.5 *v/v*).

**Table 1.** The Selected Plackett-Burman design, parameters evaluated, results of the experiments and effects (E).

Exp	pH	Dummy	Temp	Detector	Dummy	Dummy	Dummy	%ACN	Column	Flow	Dummy	%	R	As	N	k'
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	63.66	1.76	1.04	7811.64	9.76
2	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	63.61	1.65	1.01	8405.90	7.22
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	65.85	1.63	0.99	8421.00	6.01
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	63.11	1.65	1.02	10796.19	5.97
5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	63.20	1.67	1.01	9812.84	5.53
6	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	63.28	1.81	1.01	10640.73	8.99
7	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	63.38	1.46	1.02	7177.64	6.62
8	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	61.86	1.96	1.01	10824.94	7.42
9	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	62.96	2.19	1.00	10489.26	9.37
10	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	62.11	1.37	1.02	7460.25	4.84
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	62.12	2.36	1.02	11110.12	13.27
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63.12	1.57	1.02	8794.85	7.73
E <sub>%</sub>	0.23	-0.61	0.24	0.33	-0.02	0.78	1.02	0.13	-0.86	-0.18	-0.92	(SE) <sub>e%</sub> = 0.758				
E <sub>R</sub>	0.27	0.01	0.11	0.02	0.00	-0.02	-0.05	-0.27	0.37	-0.09	0.02	(SE) <sub>eR</sub> = 0.027				
E <sub>As</sub>	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	(SE) <sub>eAs</sub> = 0.008				
E <sub>N</sub>	-12.69	-28.16	-57.77	122.42	-252.79	14.79	19.35	-459.94	2600.47	-826.77	-84.37	(SE) <sub>eN</sub> = 120				
E <sub>k'</sub>	2.03	-0.60	-0.04	0.83	0.67	-0.48	-0.73	-3.32	1.40	-0.42	0.67	(SE) <sub>eK'</sub> = 0.633				

%; degradation determination; ACN: acetonitrile; R: resolution; As: asymmetry; N: theoretical plates; k' : retention factor.

Robustness was studied by small and deliberately changing in the chromatographic method (pH, temperature, wavelength, percentage of organic phase, flow-rate and supplier column). For robustness experiments, the luliconazole CRS solution was injected and a solution of luliconazole exposed to UV-C radiation. The quantification study was performed by degradation percentage of luliconazole under the stress condition. No significant changes in the chromatographic method were made in the experimental, thus considering the robust method. The statistical results obtained shows (table 1) that there is no statistically significant difference using the *t*-test ( $t_{\text{calc}} < t_{\text{critical}}$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

The selectivity was assessed to provide an indication of the stability-indicating properties of the analytical method. The luliconazole solution was submitted under stress conditions, such as acid and alkaline hydrolysis, oxidation effect, thermal condition and UVC radiation. The LC method did not show any interference by the solvent used to dissolve the chemical reference substance, no other peaks were evidenced at the same retention time of luliconazole (figure 3A) and the method could separate the potential degradation product from the drug peak. The peak purity analysis was evaluated using the software tool of photodiode-array detector, which supported the selectivity of the method for luliconazole peak purity. It was objectified 5-20% drug degradation, without excessive degradation that could degrade their degradation products, which could form intermediate products and the chosen temperature for thermal experiments was based on recommending degradation conditions described in literature [26, 34]. Table 2 shows the percentage of degradation under stress conditions.

The degradation in acidic conditions at room temperature (0.1 and 1 mol.L<sup>-1</sup> HCl) for 1 h and in 0.1 mol.L<sup>-1</sup> HCl at 70 °C with for 1 h showed that luliconazole was stable with no additional peak or drug degradation (figure 3B). However, when exposed in 1 mol.L<sup>-1</sup> HCl at 70 °C, the drug has a decrease in concentration (5.35%), that it was considered higher for the acceptance limits in this study. Thus, demonstrating the influence of the temperature at the drug degradation (figure 3C). Although, it was not detected any degradation product peak. The assay at alkaline stress condition (0.1 mol.L<sup>-1</sup> NaOH) for 1 h, demonstrated the peak area of luliconazole has a considerable decrease and three additional peaks were detected, indicating the drug instability. The use of 0.1 mol.L<sup>-1</sup> NaOH provided a fast and excessive degradation over 5-20% (figure 3D) which can point out a drastic degradation and these degradation products formed could be intermediate products. Considering this, a lower concentration of NaOH (0.01 mol.L<sup>-1</sup>) was tested to achieve a lower degradation rate and the main degradation product was still being detected at approximately 6.5 min (figure 3E).

**Table 2.** Results of forced degradation studies of luliconazole with final concentration of 20 µg.mL<sup>-1</sup>.

Degradation Conditions	Percentage (%) of luliconazole degradation (mean ± %RSD)
HCl (0.1 mol.L <sup>-1</sup> , 1 h)	0
HCl (1 mol.L <sup>-1</sup> , 1 h)	0
HCl (0.1 mol.L <sup>-1</sup> , 70 °C, 1 h)	0
HCl (1 mol.L <sup>-1</sup> , 70 °C, 1 h)	5.35 ± 1.41
NaOH (0.1 mol.L <sup>-1</sup> , 1 h)	46.77 ± 1.78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (1 h)	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (70 °C, 1 h)	19.09 ± 1.39
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (70 °C, 1 h)	61.16 ± 0.06
UV-C radiation (0.25 h)	35.94 ± 0.69
UV-C radiation (0.5 h)	45.05 ± 0.60
Thermal (70 °C, 1 h)	3.35 ± 0.38

HCl= acid hydrolysis; NaOH= alkaline hydrolysis; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= oxidation effect.

The drug was stable at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (figure 3F) and thermal condition had a small percentage of degradation (< 5%) during 1 h (figure 3G). It was not detected degradation product at both conditions. However, the luliconazole was susceptible to oxidative degradation at 70 °C, showing a reduction of 61.16% in its initial concentration when submitted at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Aiming a degradation below 20%, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was decreased to 3% and yet still demonstrated the luliconazole instability and it was observed a degradation about 19.09%, resulting in the intended degradation percentage to this study.

Similarly, at the alkaline condition, with higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, three degradation products were detected (figure 3H), but with a decreasing concentration for all of them. Two out of the three peaks are not evident anymore and the remained peak was detected at approximately 4.3 min (figure 3I).

Under the photolytic conditions, the luliconazole had a fast degradation. The drug showed about 35% of degradation after 0.25 h s under UV-C radiation and 45% of degradation after 0.5 h s of exposing, presenting high susceptibility when exposed to



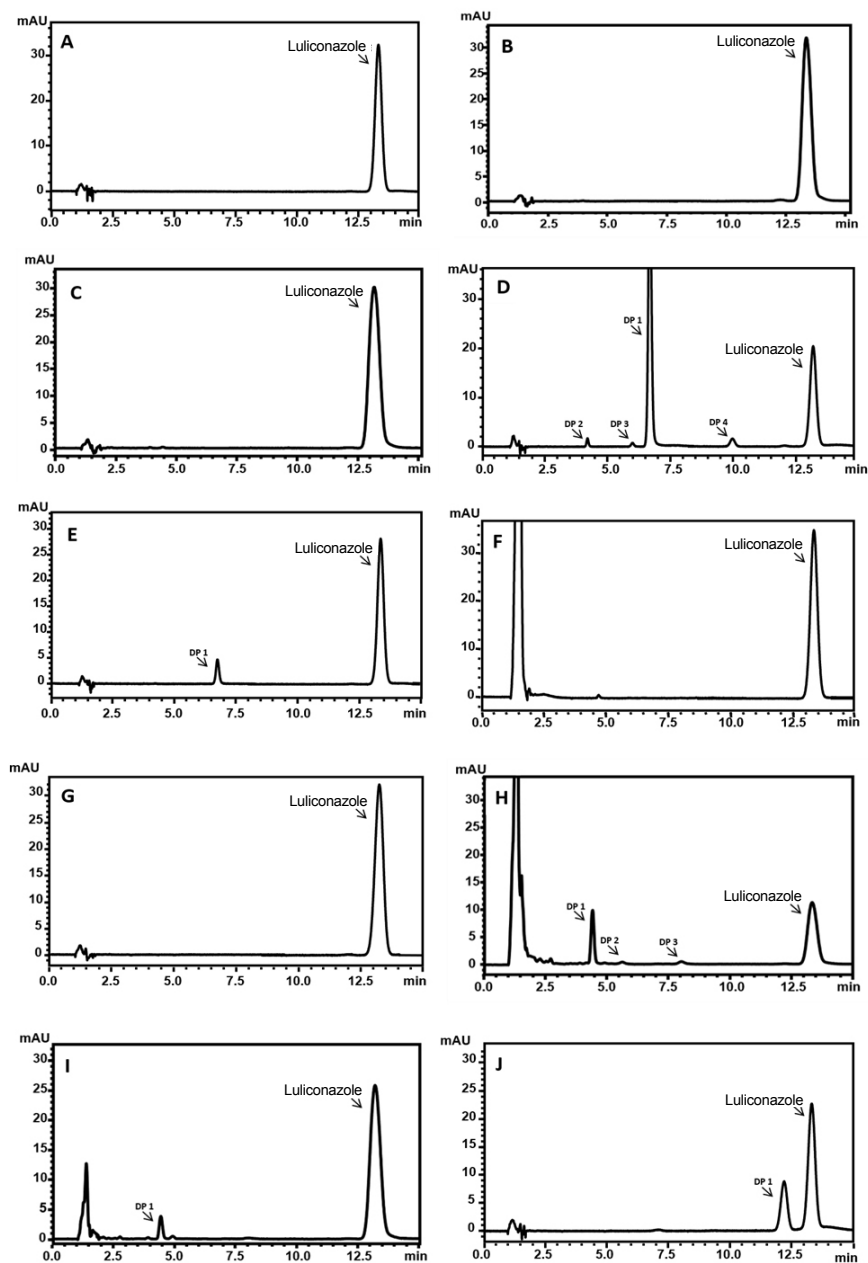
radiation. In both photolytic stress condition, the only addition peak was detected at approximately 12.1 minutes (figure 3J), as previously mentioned.

A study by Sonawane *et al.* [26] had demonstrated by using a forced degradation at similar conditions, an instability of luliconazole at acid hydrolysis with 1 mol.L<sup>-1</sup> HCl, for 75 min at 60 °C and 0.1 mol.L<sup>-1</sup> HCl, for 75 min at 100 °C. The results showed about 23% and 21% of degradation for both conditions, respectively. In this study, the same HCl concentration was used, but the exposure time and temperature were 60 min and 70 °C for both concentrations. The results were 5.35% and 0% of degradation in 1 mol.L<sup>-1</sup> and 0.1 mol.L<sup>-1</sup>, respectively, as demonstrated before in table 2. Table 2 also demonstrates the oxidative condition which during the luliconazole exposure at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% at room temperature has no degradation, condition assayed for 1 h, but when submitted at 70 °C for 1 h the drug concentration decreased at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, as well as when submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 3%. The oxidative condition was also evaluated in previously reported data [26] which demonstrated the luliconazole instability at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% for 24 h and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% for 2 and 24 h at room temperature. Due to this, the forced degradation studies presented in this study can suggest that both exposure time and temperature may contribute to the luliconazole instability.

The calibration curves were constructed by plotting concentration versus area where linearity over the 5.0-40.0 µg.mL<sup>-1</sup> range was presented. The correlation coefficient of the analytical curve was 0.9982 and the linear equation was  $y = 30294x - 4139.1$ , where x is concentration and y is the peak area. The analysis demonstrated that the regression equation was linear ( $F_{\text{calculated}} = 7506.7 > F_{\text{critical}} = 4.6$ ;  $\alpha = 0.05$ ) with no deviation from linearity ( $F_{\text{calculated}} = 2.51 < F_{\text{critical}} = 2.96$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

The precision was performed by assaying repeatability and intermediate precision. Repeatability (intra-day) has been assessed through the analysis of 6 luliconazole samples, injected in triplicate at the same concentrations. The results were  $101.19 \pm 1.37$  and  $100.88 \pm 1.20$  (mean  $\pm$  RSD). The intermediate precision (inter-day) was assessed on two different days by the same analyst and the mean  $\pm$  RSD for inter-day was  $101.04 \pm 1.19$  (n = 12). The low variability of the results indicated the precision of the method.

Accuracy was determined from recovery assays by adding known amounts of a luliconazole CRS to the sample luliconazole solution (20 µg.mL<sup>-1</sup>), corresponding 20, 50, 100%. A recovery rate of  $100.23 \pm 0.72$ ,  $99.78 \pm 0.78$  and  $99.94 \pm 0.23$  was observed for low, medium, and high levels, respectively.



**Figure 3.** Chromatograms of luliconazole ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) under stress conditions. A: Reference substance. B: Acid hydrolysis ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 1 h). C: Acid hydrolysis ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 1 h). D: Alkaline hydrolysis ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ , 1 h). E: Alkaline hydrolysis ( $0.01 \text{ mol.L}^{-1}$ , 1 h). F:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, 1 h). G: Thermal ( $70^\circ\text{C}$ , 1 h). H:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%,  $70^\circ\text{C}$ , 1 h). I:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%,  $70^\circ\text{C}$ , 1 h). J: Photodegradation UV-C (254 nm, 0.25 h).

### System suitability limits (SSL)

The SSL are essential to verify the quality of the chromatographic system, evaluating the equipment performance, analytical operations, and samples constitute [33]. The suitability system was verified and determined from the robustness experiments, by evaluating the resolution between the luliconazole peak and the photodegradation product peak. The resolution ( $R \geq 2$ ) that demonstrated adequate separation was showed in experiment 9, where the degradation product and drug had a retention time of 12.22 min and 13.36 min, respectively. Experiment 11 also demonstrated a good peak separation, however, the retention time of the luliconazole peak was 16.52 min. The other results of parameters investigated (theoretical plates and tailing factor) are summarized in table 3.

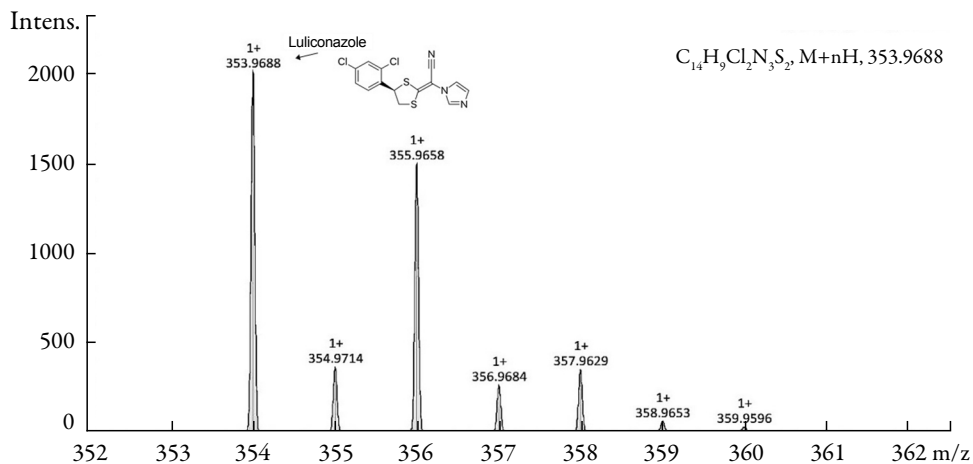
**Table 3.** SSL determination results.

Chromatographic parameter	SSL results	
	Luliconazole (mean)	Degradation product (mean)
Tailing factor	0.99	0.97
Theoretical plates	9740	9433
Resolution	2.22	-

### Isolation and structure elucidation of the degradation product

Forced degradation studies demonstrated a formation of a majority degradation product in alkaline conditions ( $0.01 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$ ) at room temperature. The DP-1 was isolated using the same chromatographic conditions described in the method validation and its molecular structure was elucidated using HRMS analysis.

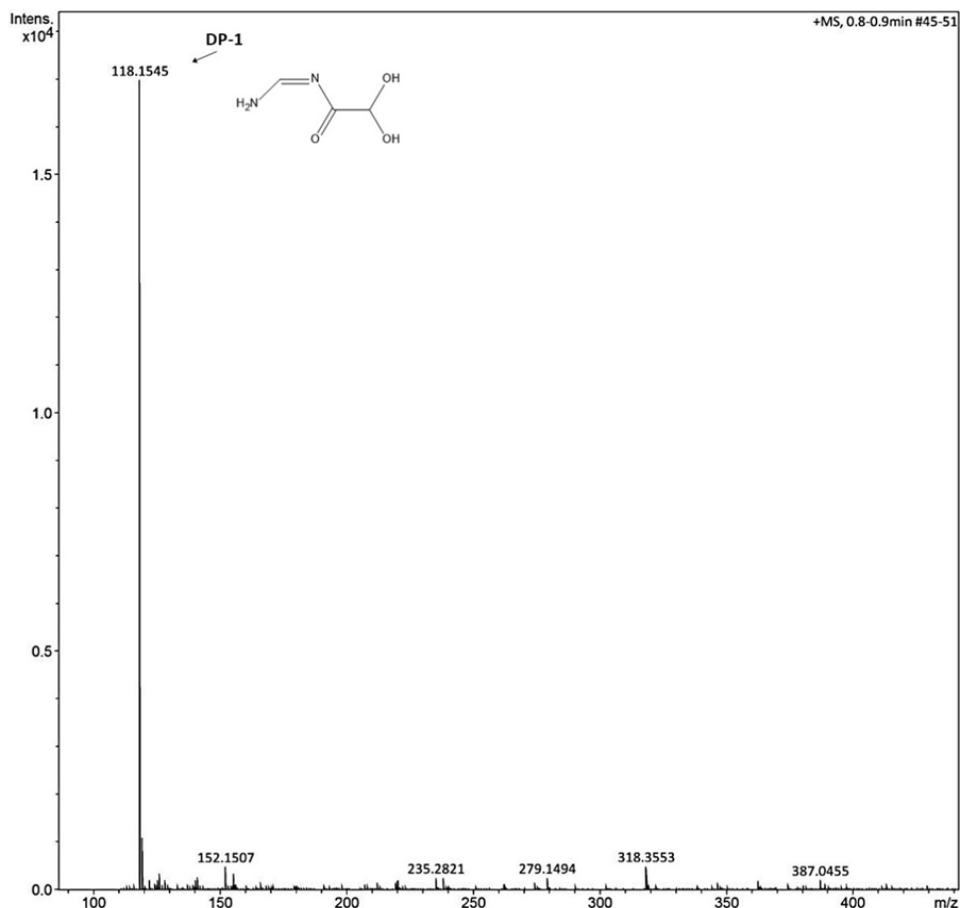
The mass spectrometer conditions were optimized with direct injection of luliconazole and DP-1 solutions ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) at a flow rate of  $3 \mu\text{L.mL}^{-1}$ . The best response was obtained with capillary voltage, extractor voltage, RF lens voltage, source temperature, APPI probe temperature and cone voltage of 3.0 kV, 3.0 V, 0.3 V; 120 °C, 350 °C and 38 V, respectively. Mass spectra of luliconazole and DP-1 were recorded in positive mode of atmospheric pressure photo-ionization (APPI) and revealed and confirm their respective molecular mass. The obtained value at  $m/z$  353.9688 [ $M + H^+$ ] it is matching with molecular weight of luliconazole (figure 4). The mass spectra of DP-1 indicated a major peak at  $m/z$  118.1545 (figure 5), which is 235 Da less than luliconazole.



**Figure 4.** Mass spectra of luliconazole CRS and its chemical structure.

The Zeneth® 7 software showed a degradation product generated at hydrolysis condition (pH 10.0) with the molecular mass corresponding to the mass spectrum of high resolution (HRMS) of DP-1 which should be assigned to hydroxyacetamide derivative. This degradation product was named as “(Z)-N-(aminomethylene)-2,2-dihydroxyacetamide” and the figure 6 demonstrates the degradation pathway of this product (DP-1). The basic hydrolysis mechanism of luliconazole should occur mainly by the degradation of the imidazole core. After protonation of the basic nitrogen of the imidazole ring, the corresponding carbons 4 and 5 should undergo nucleophilic attack of the hydroxyl leading to the formation of intermediate **D**. A deprotonation of OH group followed by hydride elimination and abstraction of the proton of nitrogen forms the intermediate **G** with concomitant  $H_2$  elimination [35]. Its resonance structure **H** has the negative charge in the carbon between the two sulfur atoms of the dithiolane ring and it is well stabilized by the vacant d orbitals of the vicinal sulfurs [36]. The reaction of this structure with water leads to the formation of the dicarbonyl compound **J** by the ring opening of the  $\alpha$ -hydroxy carbonyl derivative **I**. Another nucleophilic attack of the  $HO^-$  on the aldehyde of intermediate **J** leads to the generation of the hydrate **L**. After the formation of a hydrate, the imine in which the nitrogen atom is attached to the electron-withdrawing group cyano is very susceptible to nucleophilic attack by water in order to give the hemiaminal-type product **N** [37]. Acyclic hemiaminals are very readily fragmented into carbonyl compounds and amines. Therefore, the hemiaminal fragmentation, in the presence of water, releases the DP-1 from the structure.

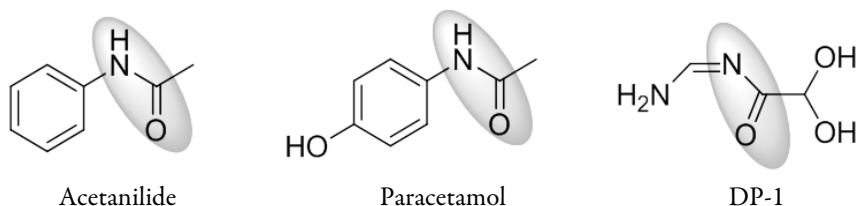
Acetamide groups are widely present in molecules used to treat diseases. This group is present, for example, on the structure of the analgesic and antipyretic drugs acetanilide



**Figure 5.** Mass spectra of degradation product by alkaline hydrolysis and its probable chemical structure.

(*N*-phenylacetamide) and paracetamol (*N*-acetyl-*para*-aminophenol). From this, other acetamide derivatives were introduced in the pharmaceutical field with varied activity [38, 39]. A study by Kaplancikli *et al.* [39] with acetamide derivatives demonstrated that new drugs having the acetamide group attached to benzothiazole and tetrazole rings contribute to reducing the nociceptive response. Arylacetamide derivatives are also compounds that have been reported with good antiprotozoal, antibacterial, and anticancer activities [40-42]. These compounds are important intermediates that help to obtain new pharmacological substances [40-43]. Therefore, based on the presence of an acetamide group, the possible molecule formed at alkaline hydrolysis of luliconazole can be a promising structure from a pharmacological point of view (figure 7).





**Figure 7.** Comparison of structures of acetanilide, paracetamol, and DP-1.

### Toxicity prediction *in silico* of degradation product

Two open-source programs were used to predict theoretical toxicity of DP-1. The *in silico* properties are given in table 4, where shows that DP-1 has no risk to cause any theoretical toxicity, such as mutagenic, tumorigenic, irritant, and reproductive effect, calculated by OSIRIS. Furthermore, the DP-1 also has no risk to cause AMES toxicity, hepatotoxicity and, mainly, has no skin sensitization, which is an important side effect to evaluate due to the drug administration route since a positive result to this parameter could mean that the compound can induce allergic contact dermatitis. No result demonstrated the similar effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, remaining the same results obtained for *in silico* prediction of luliconazole, suggesting that the DP-1 is not potentially toxic to the organism. Toxicity studies of degradation products are necessary to indicate the caution that should be taken with drugs.

**Table 4.** Prediction of theoretical toxicity risks of degradation product (DP-1) in comparison with luliconazole and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Toxicity risks	Compound		
	DP-1	Luliconazole	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Mutagenic*	(-)	(-)	(+++)
Tumorigenic*	(-)	(-)	(+++)
Irritant*	(-)	(-)	(+++)
Reproductive effect*	(-)	(-)	(+)
AMES toxicity**	No	No	-
Hepatotoxicity**	No	No	-
Skin sensitization**	No	No	-

Variation from scale of risk: no (-), low (+), medium (++) or high (+++) to OSIRIS Property Explorer\* and yes or no to pkCSM\*\*.

## CONCLUSION

A simple and selective method for the quantitative determination of luliconazole by high performance liquid chromatography has been developed. The method was developed and validated with selectivity, capable of separating the drug peak with its respective degradation products, linearity, precision, accuracy, and robustness. The chromatographic system provided a good peak shape and acceptable resolution in analysis time of about 15 min. Study of stability at different conditions proved that the drug is stable under some conditions; however, instable under alkaline and UV-C radiation stress condition, due to this, the drug must be kept protected of the light. The alkaline condition demonstrated an unknown degradation product, which was analyzed by HRMS after isolation, showing a main peak at  $m/z$  118.1545 relative to molecular weight of the product. The method was validated according to ICH guidelines and due to these characteristics, the method can be routinely used in quality control testing as there is no official method available.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CNPq (Brazil) for the financial support (Project Universal CNPQ 457629 2014/2) and Federal University of Pampa (UNIPAMPA).

## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## REFERENCES

1. D. Khanna, S. Bharti, Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review, *Core Evid.*, **9**, 113-124 (2014).
2. R. Prasad, A.H. Shah, M.K. Rawal, Antifungals: Mechanism of action and drug resistance. In: *Yeast Membrane Transport*, Edited by J. Ramos, H. Sychrová, M. Kschischo, Springer, Cham, 2016, Vol. 892, pp. 327-349.
3. H. Koga, Y. Nanjoh, K. Makimura, R. Tsuboi, *In vitro* antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole, *Med. Mycol.*, **47**, 640-647 (2009).
4. M.H. Gold, J.T. Olin, Once-daily luliconazole cream 1% for the treatment of interdigital tinea pedis, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, **13**, 1433-1440 (2015).



5. A. Shokri, M. Abastabar, M. Keighobadi, S. Emami, M. Fakhar, S.H. Teshnizi, K. Makimura, A. Rezaei-Matehkolaei, H. Mirzaei, Promising antileishmanial activity of novel imidazole antifungal drug luliconazole against *Leishmania major*: In vitro and *in silico* studies, *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **14**, 260-265 (2018).
6. S. Taghipour, N. Kiasat, S. Shafiei, M. Halvaezadeh, A. Rezaei-Matehkolaei, A.Z. Mahmoudabadi, Luliconazole, a new antifungal against *Candida* species isolated from different sources, *J. Mycol. Med.*, **28**, 374-378 (2018).
7. M. Ghannoum, Azole resistance in dermatophytes, *J. Am. Podiatric Med. Assoc.*, **106**, 79-86 (2016).
8. A.K. Gupta, D. Daigle, A critical appraisal of once-daily topical luliconazole for the treatment of superficial fungal infections, *Infect. Drug Resist.*, **9**, 1-6 (2016).
9. M. Blessy, R.D. Patel, P.N. Prajapati, Y.K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs -A review, *J. Pharm. Anal.*, **4**, 159-165 (2014).
10. A. Ayre, P. Mane, K. Ghude, M. Nemade, P. Gride, Implementing Quality by Design -A methodical approach in the RP-HPLC method development process, *Int. J. Adv. Pharm. Anal.*, **4**, 1-6 (2014).
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substance and Products: methodology Q1A(R2), URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Step4.pdf>, accessed December 2019.
12. S.R.O. Melo, M. Homem-de-Mello, D. Silveira, L.A. Simeoni, Advice on degradation products in pharmaceuticals: A toxicological evaluation, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **68**, 221-238 (2014).
13. S. Torres, R. Brown, R. Szucs, J.M. Hawkins, T. Zelesky, G. Scrivens, A. Pettman, M.R. Taylor, The application of electrochemistry to pharmaceutical stability testing. Comparison with *in silico* prediction and chemical forced degradation approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **115**, 487-501 (2015).
14. C. Foti, K. Alsante, G. Cheng, T. Zelesky, M. Zell, Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **49**, 89-99 (2013).
15. K.M. Alsante, K. Huynh-Ba, S.W. Baertschi, R.A. Reed, M.S. Landis, M.H. Kleinman, C. Foti, V.M. Rao, P. Meers A. Abend, D.W. Reynolds, B.K. Joshi, Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 1: Predicting

- degradation related impurities and impurity considerations for pharmaceutical dosage forms, *AAPS PharmSciTech*, **15**, 198-212 (2014).
16. A.D.C. Parenty, W.G. Button, M.A. Ott, An expert system to predict the forced degradation of organic molecules, *Mol. Pharmaceutics*, **10**, 2962-2974 (2013).
  17. A. Naz, R. Iqtadar, F.A. Siddiqui, Z. Ul-Haq, Degradation kinetics of fluvoxamine in buffer solutions: *In silico* ADMET profiling and identification of degradation products by LC-MS/ESI, *Arabian J. Chem.*, **13**, 4134-4146 (2020).
  18. S.W. Baertschi, J. DiMartino, *An Update for Pharmaceutical Stress Testing Enabled by Modern Informatics Technologies*, URL: <https://www.acdlabs.com/download/whitepaper/whitepaper-stress-testing.pdf>, accessed January 2020.
  19. M.H. Kleinman, S.W. Baertschi, K.M. Alsante, D.L. Reid, M.D. Mowery, R. Shimanovich, C. Foti, W.K. Smith, D.W. Reynolds, M. Neffiu, M.A. Ott, *In silico* prediction of pharmaceutical degradation pathways: a benchmarking study, *Mol. Pharmaceutics*, **11**, 4179-4188 (2014).
  20. Y. He, G. Peiwu, C. Wang, Y. Lian, Z. Liu, S. Yang, Y. Lin, C. Wen, T. Ding, Pharmacokinetic study of luliconazole in rat by UPLC-MS/MS, *Lat. Am. J. Pharm.*, **34**, 810-815 (2015).
  21. S. Gummadi, M. Kommoju, Quantification and stability aspects of Luliconazole in bulk and pharmaceutical dosage forms by UV spectroscopy, *J. Drug Delivery Ther.*, **9**, 300-306 (2019).
  22. N.J. Desai, D.G. Maheshwari, UV spectrophotometric method for the estimation of luliconazole in marketed formulation (lotion), *Pharma Sci. Monit.*, **5**, 48-54 (2014).
  23. T.M. Keriwala, G. Sanghani, Z. Dedania, V.C. Jain, Development and validation of simultaneous UV spectroscopy method for luliconazole and beclomethazone dipropionate in combined pharmaceutical dosage form, *Pharma Sci. Monit.*, **10**, 93-107 (2017).
  24. M.A. Sultan, M.M.A. El-Alamin, M.A. Atia, H.Y. Aboul-Enein, Stability-indicating methods for the determination of luliconazole by TLC and HPTLC, densitometry in bulk powder and cream dosage form, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **30**, 68-74 (2017).
  25. T. Majumder, Md.R. Hasan, P. Roy, R. Pramanik, Md.N. Hasan, Method development and validation of RP-HPLC method for estimation of luliconazole in marketed formulation (Cream), *Pharma Innovation*, **8**, 103-108 (2019).

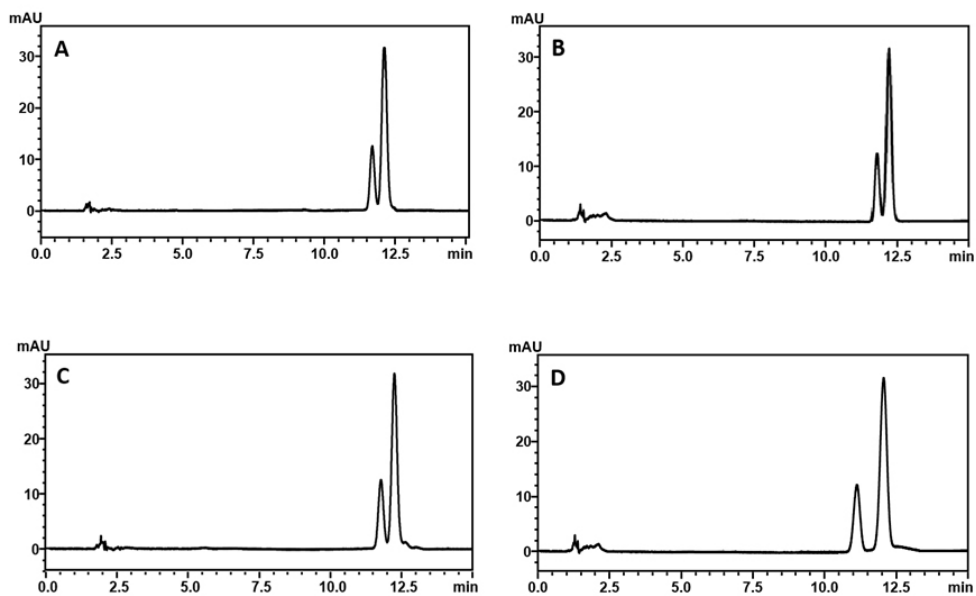
26. S. Sonawane, P. Gide, Application of experimental design for the optimization of forced degradation and development of a validated stability-indicating LC method for luliconazole in bulk and cream formulation, *Arabian J. Chem.*, **9**, 1428-1434 (2016).
27. A. Malasiya, A. Goyal, Method development and validation of RP HPLC method for assay and related substances of luliconazole in topical dosage form. *Int. J. Pharm. Chem. Anal.*, **4**, 46-50 (2017).
28. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), URL: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf), accessed December 2019.
29. Y.V. Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Mas-sart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 723-753 (2001).
30. T. Sander, *Molecular Property Prediction- Osiris Property Explorer*, URL: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, accessed April 2020.
31. D.E.V. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures, *J. Med. Chem.*, **58**, 4066-4072 (2015).
32. FDA Center for Drug Evaluation and Research, Reviewer guidance: valida-tion of chromatographic methods, URL: <https://www.fda.gov/media/75643/download>, accessed December 2019.
33. G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chro-matogr. A.*, **987**, 57-66 (2003).
34. K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **59**, 29-37 (2007).
35. T.A. Geissman, The Cannizzaro Reaction. In: *Organic Reactions*, Edited by R. Adams, Wiley-Interscience, New York, 1991, Vol. 2, pp. 99-113.
36. C.F. Bernasconi, K.W. Kittredge, Carbanion stabilization by adjacent sulfur: polar-izability, resonance, or negative hyperconjugation? experimental distinction based

- on intrinsic rate constants of proton transfer from (phenylthio)nitromethane and 1-nitro-2-phenylethane, *J. Org. Chem.*, **63**, 1944-1953 (1998).
37. O.J. Mieden, C. Von-Sonntag, Oxidation of cyclic dipeptide radicals in aqueous solution: the rapid hydration of the intermediate 1,6-dihydropyrazine-2,5-diones (cyclic dehydrodipeptides). A pulse-radiolysis study, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **12**, 2071-2078 (1989).
38. R.K. Singh, A. Kumar, A.K. Mishra, Chemistry and pharmacology of acetanilide derivatives: a mini review, *Lett. Org. Chem.*, **16**, 6-15 (2019).
39. Z.A. Kaplancikli, M.D. Altintop, G. Turan-Zitouni, A. Ozdemir, O.D. Can, Synthesis and analgesic activity of some acetamide derivatives, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **27**, 275-280 (2012).
40. S.N. Lavorato, M.C. Duarte, P.H.R. De Andrade, E.A.F. Coelho, R.J. Alves, Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **53**, 1-7 (2017).
41. E. Hernández-Núñez, H. Tlahuext, R. Moo-Puc, D. Moreno, M.O. González-Díaz, G.N. Vázquez, Design, synthesis and biological evaluation of 2-(2-amino-5(6)-nitro-1H-benzimidazol-1-yl)-narylacetamides as antiprotozoal agents, *Molecules*, **22**, 1-16 (2017).
42. P.M.P. Ferreira, K.C. Machado, S.N. Lavorato, F.C.E. De Oliveira, J.N. Silva, A.A.C. de Almeida, L.S. Santos, V.R. Silva, D.P. Bezerra, M.B.P. Soares, J.M.C. Souza, V.G. Maltarollo, R.J. Alves, Pharmacological and physicochemical profile of arylacetamides as tools against human cancers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **380**, 114692 (2019).
43. S.A. Katke, S.V. Amrutkar, R.J. Bhor, M.V. Khairnar, Synthesis of biologically active 2-chloro- n-alkyl / aryl acetamide derivatives, *Int. J. Pharma Sci. Res.*, **2**, 148-156 (2011).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

D.d.S. Porto, L. Bajerski, M.D. Malesuik, J. Braun-Azeredo, F. Reisdorfer-Paula, C. Soldateli-Paim, Luliconazole: Stability-indicating LC method, structural elucidation of major degradation product by HRMS and *in silico* studies, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 61-85 (2021).

## ANNEXED



**Figure S1.** Chromatograms obtained from luliconazole and photodegradation product at different temperatures. A: 35 °C ( $R = 1.36$ ). B: 40 °C ( $R = 1.41$ ). C: 45 °C ( $R = 1.63$ ). D: 50 °C ( $R = 2.01$ ).

## Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier

Margarita Báez\*, Esther Inés Torres, Ana Elena Gruszycki, Daniel Andrés Alba, Gabriela Malena Valenzuela, Mabel Rosalía Gruszycki

Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina

\*Autora para correspondencia: mbaez@uncaus.edu.ar, teléfono: +54-0364-688737.

Recibido: 4 de septiembre de 2020

Revisado: 10 de octubre de 2020

Aceptado: 13 de octubre 2020

### RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. **Materiales y métodos:** se obtuvieron extractos hidroalcohólicos utilizando como solventes etanol (EtOH) y metanol (MeOH) en diferentes concentraciones. Los fenoles totales y los flavonoides se cuantificaron con el método de Folin Ciocalteu y el de complejación de aluminio respectivamente. **Metodología:** para determinar la actividad antioxidante en los extractos se utilizó la técnica de decoloración del radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y para la actividad antiinflamatoria se evaluó la capacidad inhibitoria de la enzima lipoxigenasa (LOX). **Resultados:** el extracto etanólico al 70% presentó mayor capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH• y mayor inhibición sobre la enzima lipooxigenasa como respuesta antiinflamatoria, lo cual estaría relacionado con el contenido de fenoles y flavonoides. **Conclusiones:** esto sugiere que el *K. daigremontiana* posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

*Palabras clave:* *Kalanchoe daigremontiana*, polifenoles, antioxidantes, antiinflamatorios.

## SUMMARY

### Antioxidant and anti-inflammatory activity in hydroalcoholic extracts of *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier

**Aim:** To evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity in hydroalcoholic extracts of the aerial parts of *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. **Materials and methods:** Extracts were obtained using ethanol (EtOH) and methanol (MeOH) as solvents at different concentrations. Total phenols and flavonoids were quantified using the Folin-Ciocalteu method and the aluminum complexation reaction, respectively. **Methodology:** The antioxidant activity of the extracts was determined using the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) free radical discoloration technique, while lipoxygenase (LOX) inhibition assays were used to measure the anti-inflammatory activity. **Results:** The 70% ethanolic extract showed a greater antioxidant capacity against DPPH• and a greater inhibition of the lipoxygenase enzyme, which should be related to the overall phenols and flavonoids content, suggesting that *K. daigremontiana* exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties.

*Keywords:* *Kalanchoe daigremontiana*, polyphenols, antioxidants, anti-inflammatories.

## RESUMO

### Atividade antioxidante e anti-inflamatória em extratos hidroalcoólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier

**Objetivo:** avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória em extratos hidroalcoólicos da parte aérea de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. **Materiais e métodos:** os extratos foram obtidos usando etanol (EtOH) e metanol (MeOH) como solventes em diferentes concentrações. Fenóis e flavonóides totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e pela reação de complexação com alumínio, respectivamente. **Metodologia:** a atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela técnica de descoloração do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidracila), enquanto ensaios de inibição da lipoxigenase (LOX) foram utilizados para medir a atividade antiinflamatória. **Resultados:** o extrato etanólico 70% apresentou maior capacidade antioxidante contra DPPH• e maior inibição da enzima lipoxigenase, que deve estar relacionada ao teor geral de fenóis e flavonóides, sugerindo que *K. daigremontiana* apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

*Palavras-chave:* *Kalanchoe daigremontiana*, polifenóis, antioxidantes, anti-inflamatórios.

## INTRODUCCIÓN

El creciente interés por la medicina alternativa ha promovido el uso de productos de origen vegetal para diversas terapias. El uso de hierbas medicinales es común a todas las culturas. Para millones de personas estas constituyen una de las principales fuentes para el mantenimiento de la salud, la prevención y el tratamiento de enfermedades, particularmente las enfermedades crónicas [1, 2].

Las hierbas medicinales se encuentran integradas significativamente dentro de las prácticas médicas aceptadas en países como China y Japón. En otras naciones, las plantas se utilizan para prevenir el desarrollo de enfermedades, mejorar la salud y bienestar o, en raras ocasiones, como alternativa a la medicina convencional [2].

Diversas especies de *Kalanchoe* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional como antiinflamatoria y analgésica. Recientemente, se ha publicado que tienen propiedades citotóxicas; sin embargo, los datos sobre el uso tradicional de estas plantas en el tratamiento de tumores son extremadamente limitados [3].

El género *Kalanchoe* cuenta con 150 especies aproximadamente, algunas muy reconocidas como *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (*K. pinnata*) [4-6], *Kalanchoe brasiliensis* Cambess (*K. brasiliensis*) [4, 5, 6], *Kalanchoe gracilis* (L.) DC (*K. gracilis*) [7], *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet. & H. Perrier (*K. daigremontiana*) [8-11], *Kalanchoe millotii* Raym.-Hamet & H. Perrier (*K. millotii*) [9], *Kalanchoe nyikae* Engl. (*K. nyikae*) [9] son fuertemente estudiadas, se les atribuyen propiedades medicinales debido a la presencia de bufadienólidos, un grupo de polihidroxi esteroides C-24 y sus glucósidos, de gran interés por sus actividades cardiotónicas y anticancerígenas [3, 12].

La especie *K. daigremontiana* es una planta suculenta, originaria de Madagascar, perteneciente a la familia Crassulaceae, que se ha adaptado a diferentes ecosistemas, por su resistencia a condiciones adversas, lo que le ha permitido diseminarse en zonas tropicales y templadas [10]. Su característica principal es producir pequeñas plántulas o hijuelos, que nacen entre los dientes del margen aserrado del foliolo. Alcanza hasta 120 cm de longitud, posee hojas opuestas decusadas, lanceoladas, aserradas, de color verde en su haz y marcas púrpuras en el envés, sus flores son tubulares de color rojo-anaranjado que se agrupan en una inflorescencia tipo umbela. Presenta reproducción sexual y por su capacidad de generar plántulas en el margen de sus hojas, muchas de las especies son conocidas como madre de miles [10, 11]. Se encuentran principalmente en áreas tropicales y subtropicales de África, Asia y América [3]. También tiene los sinónimos *Kalanchoe madagascar*, *Bryophyllum daigremontianum* y, nombres comunes como aranto o espinazo del diablo, mala madre, madre de miles, entre otros [3, 11, 13].



Las especies de *Kalanchoe* se han utilizado en diversos tratamientos como como lesiones periodontales y de la piel, infecciones del oído, tos, úlceras gástricas y artritis. Los extractos crudos o el jugo de las especies de estas plantas también exhiben propiedades anticancerígenas; sin embargo, en el campo de la etnomedicina, solo *K. brasiliensis* se ha descrito en la literatura como un remedio para tratar el cáncer de próstata humano [3]. En cuanto a *K. daigremontiana*, esta planta tiene actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas [3, 13, 14]. Sin embargo, el efecto de sus extractos en las células cancerosas solo se probó en las células T de leucemia linfoblástica humana [3]. En China, *K. daigremontiana* se ha utilizado durante cientos de años tanto por vía oral como tópica para tratar afecciones como el vómito sanguíneo, quemaduras y cuadros gripales [15]. Tradicionalmente, las infusiones o decocciones de sus hojas son utilizadas como tratamiento alternativo para distintas dolencias como fiebre, hipertensión, relajante muscular, sedante, antihistamínico, entre otros [10].

Recientemente, *K. daigremontiana* se ha convertido en una fuente de nuevos compuestos para el tratamiento de tumores y enfermedades inflamatorias y alérgicas [15]. Se aislaron esteroides cardiotónicos bufadienólidos de *K. daigremontiana*, los cuales presentaron efectos inhibitorios sobre un tipo de virus (Epstein-Barr) que ataca los linfocitos B y se asocia con el desarrollo de muchas clases de neoplasia. Además de su capacidad anticancerígena, estos compuestos esteroideos presentaron actividad insecticida [16]. Los compuestos antioxidantes presentes en diferentes plantas juegan un papel importante como factores promotores de la salud. Estas moléculas reducen el riesgo de enfermedades crónicas, como las enfermedades cardíacas. Las propiedades farmacológicas de la planta no se deben a un solo mecanismo, sino que exhiben su efecto protector a través de una combinación de los mismos [13].

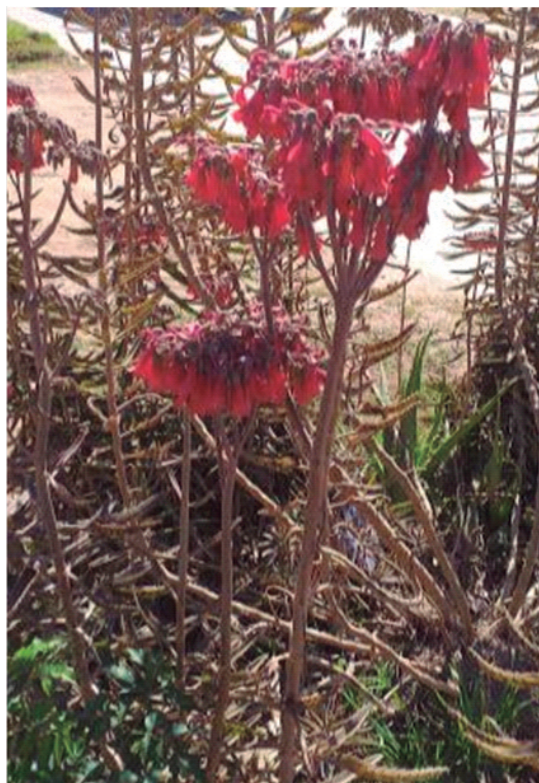
El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de *K. daigremontiana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y preparación de la muestra

Los ejemplares de *K. daigremontiana* (figura 1) se recolectaron en la zona urbana del departamento Comandante Fernández, provincia del Chaco, Argentina, entre los meses de enero a marzo de 2019. La localización para la especie estudiada según coordenadas fue 26°47'03.3"S 60°26'47.5"O. Las partes aéreas de las plantas fueron lavadas con agua potable, las porciones decoloradas y dañadas por insectos fueron descartadas. Luego se procedió al secado a temperatura ambiente y a la sombra, se sometió a molienda con un molino de cuchillas (TecnoDalvo®) hasta polvo grueso y, finalmente,

se almacenó a temperatura ambiente en recipientes de vidrio al abrigo de la luz y se utilizó dentro de las tres semanas posteriores.



**Figura 1.** *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier.

### Preparación de extractos

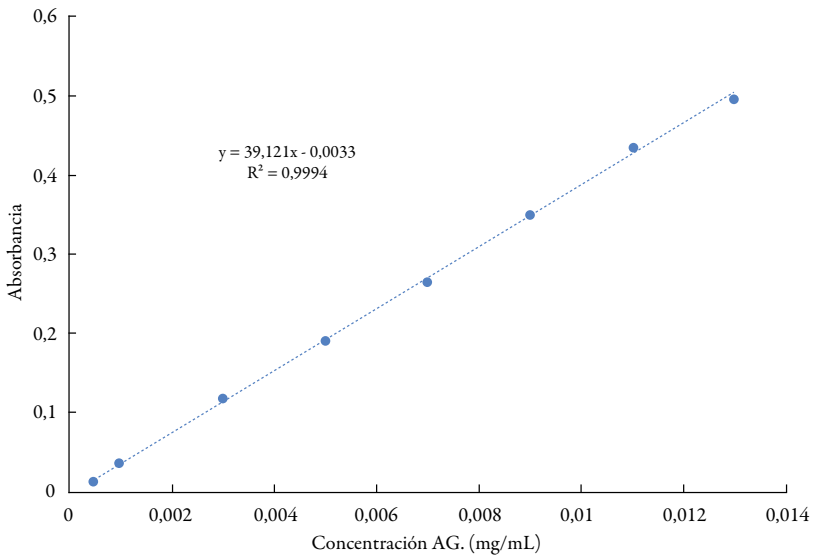
Se prepararon extractos hidroalcohólicos. Se pesaron 5 g de muestra en polvo, se colocaron en matraces cónicos y se añadió 100 mL de EtOH (etanol) al 50%, 70% y 80% (v/v) y de MeOH (metanol) al 80% (v/v) respectivamente. La muestra se dejó durante 2 h en un baño de agua con agitación a 100 rpm a una temperatura de  $40 \pm 1$  °C. El filtrado se realizó a través de papel de filtro (Whatman número 1) y el residuo se volvió a extraer nuevamente con el solvente utilizado de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Los filtrados se agruparon y el exceso del solvente utilizado se evaporó a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio, (Büchi Rotavapor R-114, Suiza). En ambos casos, los extractos concentrados se almacenaron a  $-20 \pm 1$  °C hasta su utilización. Los extractos se prepararon siguiendo el método descrito por Alam *et al.* [17], con ligeras modificaciones.

## Tamizaje fitoquímico

Los compuestos fueron identificados preliminarmente mediante los procedimientos establecidos para cada metabolito [18].

## Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando la técnica de Singleton *et al.* [19]. Este método se fundamenta en que los compuestos fenólicos reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu para formar un complejo azulado que absorbe a 765 nm. A 90  $\mu$ L de extracto de la muestra se agregaron 1,91 mL de agua desionizada y 0,2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu; después de 2 min se agregó 0,8 mL de carbonato de sodio 15,9%, se incubó a 50 °C durante 5 min y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu®). Se realizó la curva de calibración con una solución alcohólica de ácido gálico (AG) (figura 2). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco de la muestra (mg EAG/g ps muestra). Este procedimiento se efectuó con cada uno de los extractos por triplicado.

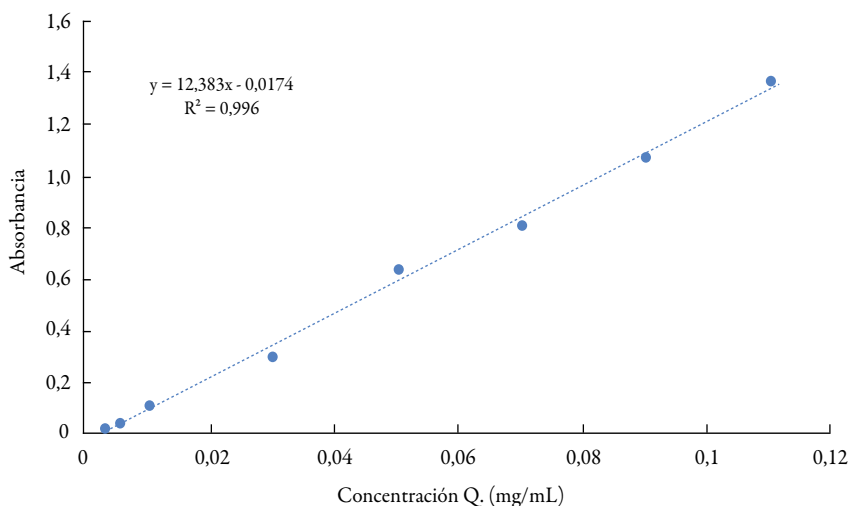


**Figura 2.** Curva de calibración para ácido gálico.

## Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides en los diferentes extractos fue determinado por el método de Popova *et al.* [20] con modificaciones. A una alícuota de 90  $\mu$ L de extracto se le adicionaron 1,91 mL de MeOH; 0,1 mL de solución etanólica de  $AlCl_3$  5% y finalmente 2,9 mL de MeOH. Se dejó durante 10 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue

medida a 425 nm en un espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu®). Se realizó la curva de calibración con una solución alcohólica de quercetina (Q) (figura 3). El contenido de flavonoides fue calculado como mg equivalentes de quercetina por g de peso seco de la muestra (mg EQ/g ps muestra). Este procedimiento se efectuó con cada uno de los extractos por triplicado.



**Figura 3.** Curva de calibración para quercetina.

### Determinación de la actividad antioxidante

Se usó el método descrito por Brand-Williams, con algunas modificaciones [21]. Este método está basado en la reducción de una solución alcohólica de DPPH• en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno. Se calculó la cantidad de antioxidantes necesarios en la muestra para reducir la concentración inicial de radical DPPH• en un 50%. Este radical fue disuelto en EtOH a diferentes porcentajes y MeOH según el extracto a ensayar; se tomaron 1 mL de solución de DPPH• ajustada hasta tener una absorbancia de 0,9 y se agregaron alícuotas del extracto a diferentes concentraciones. Se agitó el contenido de los tubos y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm y la disminución de estas fue registrada a intervalos de 0,5 min durante 7 min. La actividad se midió en un espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu®). Los resultados se expresaron como porcentajes de actividad de captación de radicales.

Porcentajes de actividad de captación de radicales (% AAR) =  $(1 - A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) \times 100$ .

El valor de  $IC_{50}$  que representa la cantidad de extracto que redujo el 50% del radical DPPH• se calculó a partir del porcentaje de captación versus la curva de concentración.

### **Determinación de la actividad antiinflamatoria**

El efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipoxigenasa (LOX) se evaluó siguiendo la metodología de Taraporewala y Kauffman [22]; que mide la cantidad de hidroxiperoxidos lipídicos producidos a partir del ácido linoleico a 234 nm. La mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ M de ácido linoleico en buffer borato 0,2 M; pH 9; 0,9 nM de 1-Lipoxigenasa de soja en buffer y diferentes concentraciones del extracto preparados en DMSO. Los reactivos utilizados fueron: buffer borato 0,2 M pH 9, solución de ácido linoleico en metanol, 5 mM, enzima 1-Lipoxigenasa de soja en buffer borato (1 mg/mL), dimetilsulfóxido y muestras en DMSO.

Para iniciar la reacción, se colocó en una celda de cuarzo 2410  $\mu$ L de buffer borato 0,2 M pH 9, se agregó 30  $\mu$ L de ácido linoleico, 20  $\mu$ L de DMSO, y 40  $\mu$ L de lipooxigenasa. Se procedió a la lectura de la absorbancia a 234 nm durante 4 min cada 30 segundos usando un espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu®). Se realizaron controles de sustrato, enzima, de solvente y extracto. Los ensayos inhibitorios se realizaron en presencia de extractos a diferentes concentraciones (25-125  $\mu$ g/mL).

Se calcularon los porcentajes de inhibición de la enzima a diferentes concentraciones de extracto por comparación con el control de 100% de actividad realizado con DMSO.

Para todos los extractos se determinó la  $IC_{50}$  a partir de las curvas de porcentaje de inhibición vs. diferentes concentraciones de extracto.

### **Análisis de datos**

Se utilizó el procedimiento de análisis de varianza (Anova) mediante el programa estadístico Statgraphics Plus. Los resultados se expresaron como media/desviación estándar.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En las pruebas fitoquímicas preliminares, los metabolitos secundarios fueron detectados de manera cualitativa mediante ensayos de coloración y precipitación de los reactivos; mostrando la presencia de flavonoides, fenoles, lípidos, hidratos de carbono, esteroides y triterpenoides, antraquinonas, alcaloides y saponinas lo cual permitió conocer que la planta tiene compuestos de alto valor farmacológico. Los metabolitos detectados coinciden con otros estudios realizados por Pinzón *et al.* [10], Puertas Mejía *et al.* [11], y Quintero Barba [23].

Los metabolitos secundarios que se encuentran comúnmente presentes en diferentes extractos de plantas son los flavonoides y los ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos al igual que el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido gálico se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y han sido reconocidos como antioxidantes naturales [13]. Se ha informado que los contenidos de fenoles y flavonoides están asociados con la actividad antioxidante en varias plantas [17]. Los compuestos fenólicos tienen una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica, han sido asociados con la capacidad atrapadora de radicales libres y se ha sugerido que tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y la carcinogénesis [24].

Estudios realizados por Puertas *et al.* [11] observaron un elevado efecto antioxidante tanto en las hojas como en las flores de *K. daigremontiana*. Este resultado lo atribuyen a los compuestos polifenólicos detectados en el análisis fitoquímico. Además, sugieren que la presencia de taninos, flavonoides, triterpenoides y antocianinas, puede estar relacionada a un efecto sinérgico entre las diferentes familias de compuestos previamente detectados, incrementando así la capacidad antioxidante.

Los valores obtenidos de fenoles totales y flavonoides en los extractos hidroalcohólicos estudiados de *K. daigremontiana* se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Fenoles totales y flavonoides.

	<b>Fenoles totales (mg EAG/g peso seco)</b>	<b>Flavonoides (mg EQ/g peso seco)</b>
EtOH 50%	11,04 ± 0,10	2,25 ± 0,04
EtOH 70%	14,17 ± 0,24	5,07 ± 0,05
EtOH 80%	12,10 ± 0,10	4,80 ± 0,40
MeOH 80%	3,04 ± 0,10	4,48 ± 0,37

El valor más alto de fenoles totales se determinó para el extracto etanólico al 70% (14,17 ± 0,24 mg de EAG/g peso seco), seguido por el de 80% (12,10 ± 0,10 mg de EAG/g peso seco), el de 50% (11,04 ± 0,10 mg de EAG/g peso seco) y por último el extracto metanólico 80% (3,04 ± 0,10 mg de EAG/g peso seco). Shujaat *et al.* [13] trabajaron con varios extractos y reportaron para el etanólico al 70%, un valor considerablemente menor al hallado en nuestro estudio (0,27 ± 0,05 mg de EAG/g peso seco). Bogucka-Kocka *et al.* [9] evaluaron la composición de ácido fenólico en hojas de cuatro especies de *Kalanchoe* y los resultados mostraron que para *K. daigremontiana*; utilizando el método de extracción acelerada de solvente (ASE), contenía las mayores

cantidades de ácidos fenólicos (124  $\mu\text{g/g}$  de peso seco), mientras que *K. nyikae* los más bajos (9,61  $\mu\text{g/g}$  de peso seco).

El contenido de flavonoides para los extractos etanólicos fue de  $5,07 \pm 0,05$ ;  $4,80 \pm 0,40$  y  $2,25 \pm 0,04$  mg EQ/g peso seco, para las concentraciones de 70%, 80% y 50% respectivamente; respecto al extracto metanólico al 80% el contenido de flavonoides hallado fue de  $4,48 \pm 0,37$  mg EQ/g peso seco. Shujaat *et al.* [13] hallaron para flavonoides valores mayores en el extracto etanólico al 70%. Asiedu-Gyekye *et al.* [25] encontraron en extracto metanólico de otras especies de *Kalanchoe* (*pinnata* e *integra*) valores muy superiores en fenoles totales y flavonoides. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que el EtOH al 70% es el solvente más adecuado para la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides en esta especie.

La actividad antioxidante se analizó utilizando la capacidad de captación de radicales libres DPPH• cuyos valores de ( $\text{IC}_{50}/\% \text{AAR}$ ) se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** DPPH• ( $\text{IC}_{50}/\% \text{AAR}$ ).

<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Ensayo DPPH•	
	$\text{IC}_{50}$ (mg/mL)	% AAR (5 mg/mL)
Solvente		
EtOH 50%	$4,41 \pm 0,18$	53,74
EtOH 70%	$3,01 \pm 0,16$	56,87
EtOH 80%	$3,80 \pm 0,04$	54,40
MeOH 80%	$3,51 \pm 0,10$	55,52

La capacidad de captación de radicales libres de DPPH• del extracto etanólico al 70% fue mayor respecto del extracto metanólico. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  para los extractos etanólicos al 70%, 80% y 50% estudiados fueron de  $3,01 \pm 0,16$ ;  $3,80 \pm 0,04$  y  $4,41 \pm 0,18$  mg/mL respectivamente, y el metanólico 80% fue de  $3,51 \pm 0,10$  mg/mL. En el estudio de Bogucka-Kocka *et al.* [9] con extractos etanólicos al 70% de *K. daigremontiana*, mostraron una gran variación en la actividad de la capacidad de captación de radicales libres DPPH• entre el extracto obtenido por maceración respecto del preparado por el método de extracción acelerada de solventes. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  para los dos extractos fueron de  $0,18 \pm 1$  mg/mL y  $1,45 \pm 8$  mg/mL indicando una actividad antioxidante más alta para el obtenido por maceración. Estos valores revelaron una mayor actividad antioxidante comparado con los hallados en nuestro estudio respecto del radical DPPH•, al igual que los resultados hallados por Shujaat *et al.* [13], en extractos etanólicos de hojas *K. daigremontiana*, cuyo valor de  $\text{IC}_{50}$  fue de 0,0619 mg/mL. En una

investigación realizada por Zhen-Rung Lai *et al.* [26] en extracto metanólico de *K. gracilis*, obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> de 4,90 ± 0,22 mg/mL, mostrando una actividad antioxidante más baja en esta especie, respecto a lo encontrado en nuestro trabajo. En la determinación de la actividad antirradicalaria se observó el porcentaje más alto de inhibición del radical libre de 56,87% en el extracto etanólico 70% (5 mg/mL), y el valor más bajo se dio en el extracto etanólico 50% de 53,74% (5 mg/mL).

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, el valor de IC<sub>50</sub> determinado para distintas concentraciones del extracto etanólico, de partes aéreas de *K. daigremontiana* expresada como concentración inhibitoria media fue de 21,96 ± 0,70 µg/mL, que representa la concentración que inhibe el 50% de la actividad de la enzima mostrando una fuerte actividad. Si bien existen trabajos que destacan la actividad antiinflamatoria del género *Kalanchoe* estos fueron realizados *in vivo*, no se encontró literatura respecto de la actividad de la enzima lipoxigenasa *in vitro* frente a este extracto de *K. daigremontiana*. Torres Carro *et al.* [27] estudiaron extractos hidroalcohólicos de trece plantas de la Puna Argentina y encontraron variaciones de IC<sub>50</sub> entre 132,6 ± 2,0 µg/mL y 389,2 ± 12,3 µg/mL. El extracto estudiado de *K. daigremontiana* mostró una elevada capacidad inhibitoria frente a la LOX.

Los resultados demostraron que los extractos de las partes aéreas de *K. daigremontiana* contienen metabolitos de interés terapéutico y el extracto etanólico al 70% presentó una mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, respecto a los demás extractos estudiados; lo cual podría estar directamente relacionado con su mayor contenido de fenoles totales y flavonoides. Además, presentó una elevada capacidad inhibitoria frente a la LOX.

Estos hallazgos sugieren que el *K. daigremontiana* posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que la convierten en una fuente promisorias para ser utilizada con propósitos medicinales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a la Secretaría de Investigación, Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Chaco Austral.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la realización de este trabajo.



## REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO), *WHO Traditional Medicine Strategy, 2014-2023*, URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/92455>, consultado en septiembre de 2020.
2. E.Y. Enioutina, E.R. Salis, K.M. Job, M.I Gubarev, L.V. Krepkova, C.M. Sherwin, Herbal Medicines: challenges in the modern world. Part 5. Status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **10**, 327-338 (2017).
3. J. Stefanowicz-Hajduk, M. Asztemborska, M. Krauze-Baranowska, S. Godlewska, M. Gucwa, B. Moniuszko-Szajwaj, A. Stochmal, J.R Ochocka, Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines, *Planta Med.*, **86**, 239-246 (2020).
4. E.R.D. de Araújo, J. Félix-Silva, J.B. Xavier-Santos, J.M. Fernandes, G.C.B. Guerra, A.A. de Araújo, D.F. de S. Araújo, Leandro de Santis Ferreira, A.A. da Silva Júnior, M de F. Fernandes Pedrosa, S.M. Zucolotto, Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract, *Biomed. Pharmacother.*, **113**, 108721 (2019).
5. J.M. Fernandes, J. Félix-Silva, L.M. da Cunha, J.A.d.S. Gomes, E.M.d.S. Siqueira, L.P. Gimenes, N.P. Lopes, L.A. Soares, M.F. Fernández-Pedrosa, S.M. Zucolotto, Inhibitory Effects of hydroethanolic leaf extracts of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) against local effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom, *PLoS ONE*, **11**, e0168658 (2016).
6. E.R.D de Araújo, G.C.B. Guerra, D.F. de S. Araújo, A. A de Araújo, J.M. Fernandes, R.F. de Araújo Júnior, V.C. da Silva, T.G. de Carvalho, L. de S. Ferreira, S.M. Zucolotto, Gastroprotective and antioxidant activity of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf juices against indomethacin and ethanol-induced gastric lesions in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1265 (2018).
7. Z.R. Lai, W.H. Peng, Y.L. Ho, S.C. Huang, T.H. Huang, S.C. Lai, Y.R. Ku, J.C. Tsai, C.Y. Wang, Y.S. Chang, Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Kalanchoe gracilis* (L.) DC stem in mice, *Am. J. Chin. Med.*, **38**, 529-546 (2010).
8. J. Kolodziejczyk-Czepas, P. Nowak, B. Wachowicz, J. Piechocka, R. Głowacki, B. Moniuszko-Szajwaj, A. Stochmal, Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro, *Pharm. Biol.*, **54**, 3182-3188 (2016).

9. A. Bogucka-Kocka, C. Zidorn, M. Kasprzycka, G. Szymczak, K. Szewczyk, Phenolic acid content, antioxidant, and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species, *Saudi J. Biol. Sci.*, **25**, 622-630 (2018).
10. J.S.C. Pinzón, M.G. Barrera, Contribución al estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier, *Rev. Asoc. Colomb. Cienc. Biol.*, **1**, 74-83 (2018).
11. M.A. Puertas Mejía, J. Tobón Gallego, V. Arango, *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **19**, 61-68 (2014).
12. J. Kolodziejczyk-Czepas, A. Stochmal, Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity, and prospects for pharmacological use, *Phytochem. Rev.*, **16**, 1155-1171 (2017).
13. S. Shujaat, S. Chaudhary, L. Sherin, Comparison of antioxidant potential, total flavonoid, and phenolic contents of different extracts of *Kalanchoe daigremontiana* leaves, *Asian J. Org. Med. Chem.*, **2**, 5-8 (2017).
14. B. Moniuszko-Szajwaj, L. Pecio, M. Kowalczyk, A. Stochmal, New bufadienolides isolated from the roots of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae), *Molecules*, **21**, 243 (2016).
15. T. Zhong, C. Zhu, H. Zeng, L. Han, Analysis of gene expression in *Kalanchoe daigremontiana* leaves during plantlet formation under drought stress, *Electr. J. Biotechnol.*, **16**, 4 (2013).
16. U. Supratman, T. Fujita, K. Akiyama, H. Hayashi, A. Murakami, H. Sakai, K. Koshimizv, H. Ohigashi, Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* butiflora, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 947-949 (2001).
17. M.A. Alam, A.S. Juraimi, M.Y. Rafii, A. Abdul-Hamid, F. Aslani, M.M. Hasan M. Uddin, Evaluation of antioxidant compounds, antioxidant activities, and mineral composition of 13 collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 296063 (2014).
18. R.V.D. Rondina, J.D. Coussio, Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas, *Rev. Inv. Agropec. 2. Biol. Prod. Vegetal*, **6**, 352-366 (1969).
19. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.*, **299**, 152-178 (1999).

20. M. Popova, V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A.G. Sabatini, G.L. Marcazzan, S. Bogdanov, Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis, *Phytochem. Anal.*, **15**, 235-240 (2004).
21. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Sci. Technol.*, **28**, 25-30 (1995)
22. I.B. Taraporewala, J.M. Kauffman, Synthesis, and structure-activity relationships of anti-inflammatory 9,10-dihydro-9-oxo-2-acridine-alkanoic acids and 4-(2-carboxyphenyl) aminobenzenealkanoic acids, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 173-178 (1990).
23. E.J. Quintero Barba, *Estudio de la química, morfología y actividad biológica de Kalanchoe pinnata y Kalanchoe daigremontiana*, Tesis de grado, Universidad Autónoma de Chiriquí, 2018, pp. 57-59.
24. G.M. Valenzuela, A.L. Cravzov, A.S. Soro, A.L. Tauguinias, M.C. Giménez, M.R. Gruszycki, Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita* spp, *Dominguezia*, **30**, 19-24 (2014).
25. I.J. Asiedu-Gyekye, D. Ansong-Antwi, K. Agyei-Bugyei, C. Awortwe, Comparative study of two *kalanchoe* species: total flavonoid and phenolic contents and antioxidant properties, *African J. Pure Appl. Chem.*, **6**, 65-73 (2012).
26. Z.R. Lai, Y.L. Ho, S.C. Huang, T.H. Huang, S.C. Lai, J.C. Tsai, C.Y. Wang, G.J. Huang, Y.S. Chang, Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Kalanchoe gracilis* (L.) DC stem, *Am. J. Chin. Med.*, **39**, 1275-1290 (2011).
27. R. Torres-Carro, M.I. Isla, S. Thomas-Valdes, F. Jimenez-Aspee, G. Schmeda-Hirschmann, M.R. Alberto, Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna), *J. Ethnopharmacol.*, **205**, 57-68 (2017).

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M. Báez, E.I. Torres, A. E. Gruszycki, D.A. Alba, G.M. Valenzuela, M.R. Gruszycki, Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 86-99 (2021).

## Explorando os estresses oxidativo e nitrosativo contra fungos: um mecanismo subjacente à ação de tradicionais antifúngicos e um potencial novo alvo terapêutico na busca por indutores oriundos de fontes naturais

Cláudio Daniel Cerdeira<sup>1\*</sup>, Matheus Pereira de Araújo<sup>2b</sup>, Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira<sup>3c</sup>, Amanda Latercia Tranches Dias<sup>3d</sup>, Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão<sup>1c</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica (DBq), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, 37130-001, Minas Gerais (MG), Brasil.

<sup>2</sup> Department of Medicine, Dokkyo Medical University, Mibu, 321-0293, Tochigi, Japan.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI), ICB, UNIFAL-MG, Alfenas, 37130-001, MG, Brasil.

\* Autor para correspondência: [daniel.cerdeira.84@gmail.com](mailto:daniel.cerdeira.84@gmail.com), Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-7242-8028>.

<sup>a</sup> Correio eletrônico: [daniel.cerdeira.84@gmail.com](mailto:daniel.cerdeira.84@gmail.com)

<sup>b</sup> Correio eletrônico: [matheus\\_araujo88@hotmail.com](mailto:matheus_araujo88@hotmail.com)

<sup>c</sup> Correio eletrônico: [carlabrjf@gmail.com](mailto:carlabrjf@gmail.com)

<sup>d</sup> Correio eletrônico: [amanda.dias@unifal-mg.edu.br](mailto:amanda.dias@unifal-mg.edu.br)

<sup>e</sup> Correio eletrônico: [maisaunifal@gmail.com](mailto:maisaunifal@gmail.com)

Recebido: 3 de março de 2020

Revisado: 14 de setembro de 2020

Aceto: 14 de outubro de 2020

### RESUMO

**Objetivo:** nesta revisão sistemática, nós avaliamos o *link* entre indutores de estresse oxidativo e/ou nitrosativo (EO/EN) com atividade antifúngica, através de uma ação direta sobre a célula fúngica e/ou modulando a resposta de fagócitos contra fungos de interesse médico (incluindo *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp.). Ainda, foram avaliadas as implicações clínicas deste evento bioquímico, bem como as perspectivas quanto à busca por novos compostos com atividade antifúngica, principalmente, os provenientes de fonte natural e, que explorem a indução de um EO ou EN como parte de seu mecanismo de ação. **Metodologia:** Foram avaliados artigos, provenientes de diferentes bases de dados e publicados a qualquer período, acessados entre abril e junho de 2017, através da utilização de diferentes descritores. **Resultados:** Primeiramente, estabelecemos as definições de EO/EN, como sendo o

aumento das concentrações de espécies reativas do oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN) quantificado diretamente e, provenientes de fontes fúngicas mitocondriais, Reação de Fenton, retículo endoplasmático ou outras não definidas, e excedendo a capacidade de defesa antioxidante do microrganismo (avaliados por análises de perfis transcriptômicos ou proteômicos ou metabolômicos ou níveis de atividade enzimática). Este aumento de ERO/ERN causando EO/EN é definido por tempo e condições que conduzem a sinalização de apoptose ou reais danos a biomoléculas com perda de função (peroxidação lipídica ou oxidação proteica ou danos ao DNA) e, conseqüentemente, gerando morte fúngica ou outro efeito antifúngico associado. Portanto, 64 artigos (apenas um publicado antes do ano 2000 e 50 entre 2007-2017) abordam que a indução de EO ou EN na célula fúngica é parte do mecanismo de ação de clássicos agentes antifúngicos (22 publicações), tais como azóis (fluconazol, itraconazol e miconazol), polienos (anfotericina B [AnB]) e equinocandinas (micafungina), assim como tal modulação redox tem sido reportada como um importante alvo terapêutico na busca por novos e promissores compostos naturais com atividade antifúngica (32 publicações), que tem respaldo pela grande variedade de indutores que podem provir da natureza. Ainda, compostos que também induzem o *burst* oxidativo de fagócitos, incluindo AnB, são potencializadores do efeito antifúngico *in vivo*. Além do efeito antifúngico contra células planctônicas, os efeitos dos EO ou EN sobre biofilmes fúngicos, também têm sido reportados. Tem sido firmado na literatura recente um claro *link* entre EO ou EN e a atividade antifúngica, tanto para aqueles agentes antifúngicos já utilizados na terapêutica em humanos, quanto para possíveis candidatos a fármaco. Portanto, a indução do EO ou EN como parte do mecanismo de ação de antifúngicos demonstra ser um importante alvo terapêutico, com perspectivas favoráveis sobre os desfechos na prática clínica.

*Palavras-chave:* Estresse oxidativo, estresse nitrosativo, fungos, *Candida albicans*, antifúngico, produtos naturais.

## RESUMEN

Explorando los estréses oxidativos y nitrosativos contra hongos:  
un mecanismo subyacente a la acción de los antifúngicos  
tradicionales y un potencial nuevo objetivo terapéutico  
en la búsqueda de inductores de fuentes naturales

**Objetivo:** esta revisión sistemática, evaluamos el vínculo entre los inductores de estrés oxidativo o nitrosativo (EO/EN) con actividad antifúngica, a través de una acción directa sobre las células fúngicas o modulando la respuesta de los fagocitos

contra hongos de interés médico (incluyendo *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp.). Aun así, se evaluaron las implicaciones clínicas de este evento bioquímico, así como las perspectivas con respecto a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antifúngica, principalmente los de fuentes naturales y que exploran la inducción de un EO o EN como parte de su mecanismo. **Metodología:** Entre abril y junio de 2017, evaluamos artículos de diferentes bases de datos publicados en el cualquier período, utilizando diferentes descriptores. **Resultados:** Primero, establecemos las definiciones de EO/EN, como el aumento en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ERO/ERN) directamente cuantificadas y, provenientes de fuentes fúngicas mitocondriales, reacción de Fenton, retículo endoplásmico u otros no definido y que excede la capacidad de defensa antioxidante del microorganismo (evaluado por análisis de perfiles transcriptómicos o proteómicos o metabólicos o niveles de actividad enzimática). Este aumento de ERO/ERN que causa EO/EN se define por el tiempo y las condiciones que conducen a la apoptosis o daño real a las biomoléculas con pérdida de función (peroxidación lipídica y/u oxidación de proteínas o daño al ADN) y, en consecuencia, provoca la muerte microbiana u otro efecto antifúngico asociado. Por lo tanto, 64 artículos (solo uno publicado antes del año 2000 y 50 entre 2007-2017) abordan que la inducción de EO o EN en la célula fúngica es parte del mecanismo de acción de los agentes antifúngicos clásicos (22 publicaciones), como los azoles (fluconazol, itraconazol y miconazol), polienos (anfotericina B [AnB]) y equinocandinas (micafungina), así como dicha modulación redox se ha informado como un objetivo terapéutico importante en la búsqueda de compuestos naturales nuevos y prometedores con actividad antifúngica (32 publicaciones), que está respaldado por la amplia variedad de inductores que pueden provenir de la naturaleza. Además, los compuestos que también inducen la explosión oxidativa de fagocitos, incluido AnB, son potenciadores del efecto antifúngico *in vivo*. Además del efecto antifúngico contra las células planctónicas, también se han informado los efectos de EO o EN en las biopelículas fúngicas. Se ha establecido un vínculo claro entre EO o EN y la actividad antifúngica en la literatura reciente, tanto para aquellos agentes antifúngicos ya utilizados en terapia en humanos, como para posibles candidatos a fármacos. Por lo tanto, la inducción de EO o EN como parte del mecanismo de acción de los antifúngicos es un objetivo terapéutico importante, con perspectivas favorables sobre los resultados en la práctica clínica.

*Palabra clave:* estrés oxidativo, estrés nitrosativo, hongos, *Candida albicans*, antifúngico, productos naturales.

## SUMMARY

## Exploring the oxidative and nitrosative stresses against fungi: an underlying mechanism beyond the action of traditional antifungal agents and a potential new therapeutic target in searching for inducers from natural sources

**Aim:** In this systematic review, we evaluated the link between inducers of oxidative or nitrosative stresses (OS/NS) and antifungal activity against fungi of medical relevance (including *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.), through a direct action on the fungal cell or modulating phagocyte response. Moreover, the clinical implications of this biochemical event, as well as the perspectives, were examined, highlighting the search for new compounds with antifungal activity, mainly those from natural sources and, which explores the induction of OS or NS as part of the mechanism of action. **Methodology:** Articles from different databases and published at any time were evaluated, between April and June 2017, and using different descriptors. **Results:** First, a definition of OS and NS was established in which an increase in reactive oxygen or nitrogen species (ROS/RNS, quantified directly and from mitochondrial, Fenton reaction, endoplasmic reticulum or other fungal sources) should exceed the antioxidant defense capacity of the microorganism (evaluated by transcriptomic or proteomic or metabolomic profiles or enzyme activity levels). These events, by time and conditions delimited, can lead to the signaling of apoptosis or an actual damage toward biomolecules (lipid peroxidation or protein oxidation or DNA damage) and, consequently, they can cause cell death or other associated antifungal effect. Therefore, 64 articles were found, of these, only one was published before 2000 and 50 between 2007-2017, reporting the induction of OS or NS directly into the fungal cell via an increase in ROS or RNS as part of the mechanism of action of classical antifungal agents (22 publications), such as: azoles (fluconazole, itraconazole, and miconazole), polyenes (amphotericin B, [AnB]), and echinocandins (micafungin). This redox modulation has also been reported as an important therapeutic target in the search for new natural compounds with antifungal activity (32 publications), which is supported for the great variety of inducers from nature. Compounds that also induce the oxidative burst of phagocytes, including AnB, promote a combinatorial antifungal effect *in vivo*. In addition to the antifungal effect against planktonic cells, the relation between OS or NS and antifungal activity against fungal biofilms has also been reported. It has been established in the recent literature a clear link between OS or NS and antifungal effect, during the action of antifungal agents already used in the therapy in humans as well as for possible drug

candidates. Thus, the induction of OS or NS as part of the mechanism of action proves to be an important therapeutic target with favorable perspectives on the outcomes in clinical practice.

*Keywords:* oxidative stress, nitrosative stress, yeast, *Candida albicans*, antifungal, natural products.

### Abreviações, siglas e símbolos

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina

AnB - Anfotericina B

BIP - 2, 2'- biperidina

Ca<sup>+2</sup> – Íon Cálcio

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

CasP – Caspofungina

Cat – Catalase

CIM – Concentração inibitória mínima

CFM – Concentração fungicida mínima

<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub> O<sub>2</sub> - Oxigênio singlete

DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

EN - Estresse nitrosativo

EO - Estresse oxidativo

ERNS - Espécies reativas do nitrogênio

EROs - Espécies reativas do oxigênio

Fe - Ferro

Fe<sup>2+</sup> - Íon Ferroso

Fe<sup>3+</sup> - Íon Férrico

FLC - Fluconazol

fMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HO• - Radical hidroxila

HOCl - Ácido hipocloroso

IFIs - Infecções fúngicas invasivas

ITC – Itraconazol

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida



LASER – *Light amplification by stimulated emission of radiation*

LT – Laserterapia

MΦ – Macrófago

MF - Micafungina

MN – Miconazol

NAC - N-acetil-l-cisteína

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

•NO - Óxido nítrico

Nox – Subunidade catalítica de NADPH oxidases

O<sub>2</sub> - Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Superóxido

OCl<sup>-</sup> - Ânion hipoclorito

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

PMA - Acetato Miristato de Forbol

RE – Retículo endoplasmático

Sod - Superóxido dismutase

UFC - Unidade formadora de colônias

### Destaques

- Antifúngicos tradicionais e candidatos a antifúngicos podem induzir o acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica que, quando acompanhado de uma não efetiva defesa antioxidante do fungo, gera os chamados EO/EN, causando danos a biomoléculas do microrganismo e provocando uma inibição do crescimento ou morte do fungo.
- Os antifúngicos ou candidatos a antifúngicos podem incrementar a produção de oxidantes via fontes naturais de produção basal de EROs/ERNs na célula fúngica e/ou criar novos alvos redox para a produção de oxidantes, desse modo levando ao acúmulo na célula fúngica.
- Através da avaliação de sistemas de detoxificação de oxidantes em microrganismos e/ou uso de antioxidantes exógenos, o papel do EO e/ou EN no mecanismo de ação de antifúngicos tem sido estabelecido.
- Independente do EO e/ou EN induzido pelo antifúngico (ou candidato) gerar um efeito fungistático ou fungicida, o acúmulo de EROs/ERNs leva a uma diminuição da viabilidade celular e possível morte fúngica associada.
- Por outro lado, doses/concentrações sub-letais de antifúngicos pode gerar baixas produções de EROs/ERNs e, causar um *priming* da defesa antioxidante do

fungo, dessa forma esta sinalização via oxidantes pode contribuir com a resistência aos antifúngicos através de múltiplos mecanismos.

## INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas por fungos apresentam considerável incidência em todo o mundo, sendo que, os fungos considerados oportunistas (como exemplos, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp.) acometem principalmente pacientes imunocomprometidos e, os chamados patógenos fúngicos verdadeiros (como exemplos, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*), normalmente acometem tanto pacientes imunocomprometidos como os imunocompetentes. Ambos, fungos oportunistas ou patogênicos, podem causar infecções fúngicas invasivas (IFIs), com repercussão em altas taxas de mortalidade (20-90%, dependendo do contexto) [1-3].

Resistência aos agentes antifúngicos é um problema atual, sendo reportados, anualmente, aproximadamente 3400 casos de doenças infecciosas causadas por *C. albicans* resistente ao flucanazol (FLC) em hospitais dos EUA, com sérias repercussões para a saúde pública, elevando as taxas de morbimortalidade (neste caso, com aproximadamente 220 mortes anuais) e aumentando os gastos com internações e tratamentos [1, 2]. No Brasil, embora os dados sejam escassos e subestimados, a problemática quanto às infecções fúngicas e perfis de resistência aos agentes terapêuticos demonstram também serem preocupantes. Portanto, a busca por novos antifúngicos tem crescido nos últimos anos e a possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos também tem sido reavaliada [3, 4].

Neste contexto, diferentes estudos têm visado a busca por compostos que possam induzir elevada produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO/ERN) na célula fúngica [5-9]. Esta elevação de ERO/ERN, quando acompanhada de uma ineficiência dos sistemas de detoxificação redox da célula fúngica (como exemplos, das enzimas superóxido dismutase [Sod], catalase [Cat], glutathione peroxidase [GPx], tio-redoxinas, entre outras), pode culminar nos chamados estresses oxidativos ou nitrosativos (EO/EN). Como consequência do EO/EN, ocorrem, danos a importantes macromoléculas do fungo, como lipídeos, proteínas e o DNA, independentemente de a ação antifúngica principal ser fungioestática (efeito de inibição do crescimento) ou fungicida (com morte microbiana imediata) [6].

Não apenas restrito à busca por novos compostos, tem sido reportado que, consagrados fármacos antifúngicos, como exemplos, os azóis (FLC, itraconazol [ITC] e miconazol [MN]) [4, 6, 10], polienos (anfotericina B [AnB]) [11] e equinocandinas (micafun-

gina [MF]) [12], tomam parte na produção aumentada de ERO/ERN, como parcela de seus mecanismos de ação, podendo haver nestes casos, efeito fungistático ou fungicida associado ao tratamento.

A possibilidade da indução do EO ou EN como alvo no tratamento de infecções fúngicas atrai o interesse de novos estudos, uma vez que este processo pode induzir a morte fúngica, seja via apoptose ou vias correlatas (incluindo aquelas que levam a indução de danos a biomoléculas do fungo e um efeito fungicida associado) [13]. Portanto, o objetivo desta revisão sistemática foi fornecer uma visão geral sobre os estudos relacionados à indução de EO ou EN como alvo terapêutico nas infecções fúngicas, além das implicações e perspectivas quanto à exequibilidade na prática clínica.

## METODOLOGIA

Nesta revisão sistemática da literatura nós, primariamente, avaliamos a associação entre o EO ou EN e a atividade antifúngica. Para tal, foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados indicados na tabela 1, usando uma combinação dos descritores: “oxidative stress”, “antifungal”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”. As questões norteadoras desta revisão sistemática foram: Quais as reais associações entre o EO ou EN e a ação antifúngica? Como o EO ou EN podem causar danos a biomoléculas e morte fúngica? Quais fatores podem interferir ou serem considerados durante a indução de um EO ou EN por compostos de interesse? Quais são os compostos de fontes naturais que podem induzir o EO ou EN na célula fúngica? Apenas artigos publicados em periódicos, a qualquer período, foram considerados elegíveis. Dentre os critérios de elegibilidade (tabela 2) foram considerados os seguintes aspectos: (i) disponibilidade do texto integral para estudo; (ii) clareza no detalhamento metodológico utilizado (metodologia fidedigna para avaliar diretamente EROs/ERNs, danos oxidativos associados [peroxidação lipídica e danos ao DNA] e viabilidade fúngica); e (iii) relevância científica e clínica (indutores de EO ou EN com aplicabilidade clínica, com baixa toxicidade e ausência ou poucos efeitos colaterais). Para a consolidação do artigo, a contextualização do tema apresentado foi complementada com outras referências relevantes aos propósitos desta revisão.

**Tabela 1.** Estratégias de pesquisa conduzida nesta revisão sistemática sobre o tema abordado, realizada em diferentes bases de dados/domínios públicos.

Banco de dado	Palavras-chave	Período	Critérios de inclusão primária	Critérios de exclusão primária
PubMed (via PubMed); Embase (via OVID); Lilacs (via Bireme); Cochrane Library; Web of Science; Science Direct; OMIM; SciELO (via SciELO); CINAHL; MEDLINE (via Bireme); Scopus; BIOSIS; HNO	“oxidative stress”, “antifungal”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”	Sem restrição	Pertinência/relevância ao tema	Texto integral não disponível

Última pesquisa no PubMed em maio de 2017. Última pesquisa no Embase em maio de 2017. Última pesquisa no Lilacs em maio de 2017. Última pesquisa no Cochrane Library em maio de 2017. Última pesquisa no Web of Science em maio de 2017. Última pesquisa no Science Direct em maio de 2017. Última pesquisa no OMIM em maio de 2017. Última pesquisa no SciELO em maio de 2017. Última pesquisa no CINAHL em maio de 2017. Última pesquisa no MEDLINE em maio de 2017. Última pesquisa no Scopus em maio de 2017. Última pesquisa no BIOSIS em maio de 2017. Última pesquisa no HNO em maio de 2017. \*Apenas artigos publicados foram aceitos como documentos, para uma prévia triagem.

## DISCUSSÃO

Nesta revisão nós analisamos artigos que relatam sobre novos compostos com ação antifúngica, cujo mecanismo de ação, foi reivindicado para ser dependente de ERO/ERN. Além disso, nós avaliamos trabalhos que tratam de mecanismos de ação antifúngica dependente de ERO/ERN, creditados a antifúngicos rotineiramente usados na prática clínica, com possíveis mecanismos de ação paralelos ou ainda parcialmente elucidados. Motivo de controvérsias por parte da comunidade científica, o chamado “mecanismo comum para a morte microbiana” (do inglês *unified mechanism of killing*), induzida por ERO/ERN, tem sido amplamente abordado para antibacterianos e agora é relatado também para os antifúngicos [14-19]. De fato, determinados níveis de ERO/ERN tomam partes na sinalização apoptótica e [20], até o momento, está via tem sido considerada um alvo promissor para a ação de candidatos a antifúngico [7].

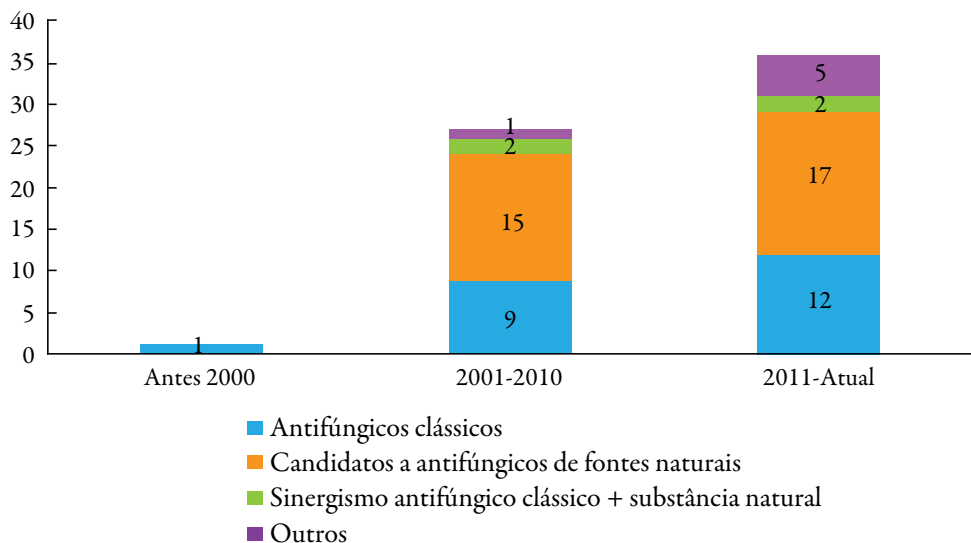
Nós realizamos criteriosa revisão sistemática, na qual 64 artigos que claramente abordavam o tema alvo (figura 1) foram encontrados. Como observado na figura 1, as pesquisas neste campo de estudo são recentes (apenas um artigo publicado antes dos anos 2000)

**Tabela 2.** Sumário dos critérios de inclusão e exclusão adotados nesta revisão sistemática.

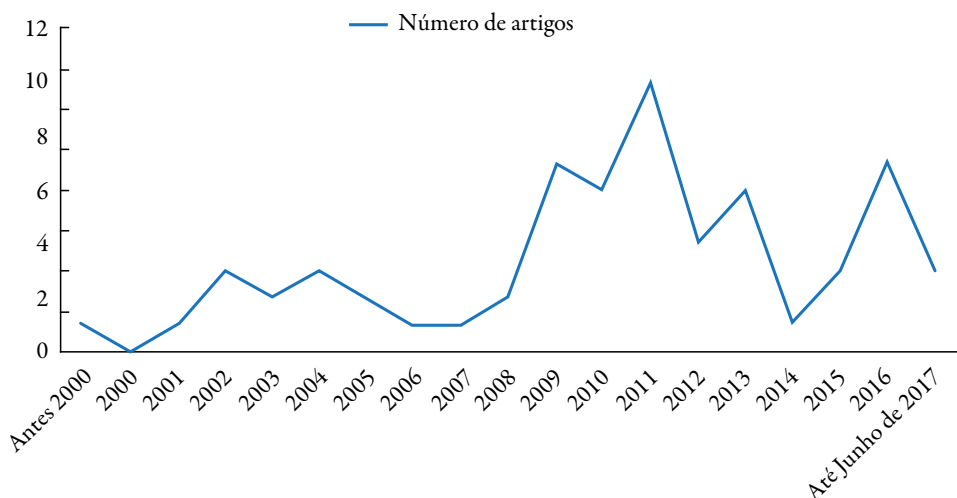
<b>Portal</b>	Descritos na tabela 1
<b>Período aceito</b>	Qualquer época
<b>Interstício</b>	Abril–junho 2017
<b>Palavras-chave</b>	“oxidative stress”, “antifungal”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”
<b>Critérios para triagem primária*</b>	(i) Dados reportando a relação entre estresse oxidativo ou nitrosativo e ação antifúngica comprovada (independente de induzir apoptose ou das ações serem fungistática ou fungicida); Relevância da proposta, plausibilidade biológica e clínica/terapêutica; (ii) Viabilidade metodológica respaldando os achados; Conclusão suportada pelos resultados; (iii) Clareza na descrição dos mecanismos que permeiam o estresse oxidativo como evento primário ou coadjuvante da ação antifúngica
<b>Tipos de documentos</b>	Apenas artigos publicados em periódicos indexados
<b>Critérios de elegibilidade</b>	(i) Disponibilidade do documento integral (ii) Metodologia apropriada (iii) Estudos com relevância científica
<b>Total de artigos abordando o tema</b>	64

\*Para produtos de origem natural, apenas compostos isolados e identificados com concentração inibitória mínima (CIM) ou concentração fungicida mínima (CFM) < 600 µg/mL e baixa ou nenhuma toxicidade para humanos (bom índice de seletividade [IS]) foram considerados.

e crescentes (50 artigos foram publicados entre 2007-2017, figura 2), visto que o tema EO ou EN é relativamente recente [21]. Controvérsias a parte, é notória a convergência de achados mostrando a estreita relação entre a indução e acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica e consequente ação antifúngica, quando a defesa antioxidante da célula microbiana é superada, desde que, na definição de “estresse oxidativo ou nitrosativo”, há favorecimento para o aumento de fatores pró-oxidantes em detrimento dos antioxidantes (sistemas de defesa enzimáticos, entre outros), por tempo e contexto definidos, levando em conta que o ambiente redox pode variar significativamente [21]. Ainda, nós consideramos possíveis ações adjuvantes dos indutores/clássicos antifúngicos, como a imunomodulação, bem como consideramos a presença de cepas fúngicas que exploram mecanismos de resistência ao EO ou EN como repertório de virulência e patogenicidade.



**Figura 1.** Número de artigos abordando o tema “Estresse oxidativo ou nitrosativo e atividade antifúngica” encontrados nesta revisão e estratificados de acordo com o foco. Antifúngicos clássicos: Aqueles usados na prática clínica (exemplos: AnB, FLC, MF); Outros: estudos que abordavam a elevação de ERO/ERN e atividade antifúngica induzida por compostos de origem sintética.



**Figura 2.** Número de artigos abordando o tema “Estresse oxidativo ou nitrosativo e atividade antifúngica” ao longo dos anos.

### Possíveis fontes de ERNs/ERNs na célula fúngica

Após estabelecer os conceitos de EO/EN, nós examinamos as fontes de ERO/ERN na célula fúngica. A produção de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), relativamente um fraco oxidante que, normalmente, é o primeiro formado dando origem a EROs/ERNs mais fortes em cascatas subsequentes, tem o oxigênio molecular ( $O_2$ ) comoceptor de elétrons. O  $O_2^{\bullet-}$  em fungos pode ser de origem mitocondrial (mais comum, por conta de um aumento na atividade da cadeia transportadora de elétrons e a consequente toxicidade do  $O_2$ ) ou originário da atividade do retículo endoplasmático (RE) [22-25]. Estruturas proteicas homólogas em fungos, semelhantes aquelas do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase encontrado em humanos, podem gerar  $O_2^{\bullet-}$  (segundo a equação:  $4 O_2 + 4 NADPH \rightarrow 4 O_2^{\bullet-} + 2 NADP^+ + 4 H^+$ ).

Quando o  $O_2^{\bullet-}$  é formado, este oxidante pode ser dismutado espontaneamente ou enzimaticamente (catalizada pela Sod, na reação:  $2 O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ), formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  pode sofrer ação de catalases/peroxidases fúngicas (como exemplo, a GPx) ou seguir diferentes caminhos originando outras EROs. Assim, o  $H_2O_2$  pode gerar radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), através da reação de Fenton e a reação acoplada de Haber-Weiss (dependentes de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ). Paralelamente, o  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir com o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) ou alguns outros compostos, gerando o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ , uma ERN). De nota, alguns destes oxidantes podem ser gerados intensamente durante ação específica de um fármaco/composto. O  $HO^{\bullet}$  e o  $ONOO^{\bullet}$  são altamente reativos e podem prontamente causar danos aos lipídios, proteínas e DNA e, na ausência ou ineficiência de sistemas de reparos destas biomoléculas, podem levar a perda de função e a morte microbiana.

Como exemplos de ativação pontual do EO em fungos, Avci *et al.* [25] mostraram que ascorbato pode eliciar aumento de EROs, exclusivamente, via reação de Fenton, com aumento de  $HO^{\bullet}$  a partir do  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ . Yu *et al.* [24] demonstraram que alguns agentes que podem perturbar a parede celular fúngica (40  $\mu g/mL$  de calcoflúor branco, em inglês *Calcofluor White* [CFW], ou 0, 1  $\mu g/mL$  de caspofungina [CasP]) causam quadro de EO (em até 60 min após o tratamento) intracelular via aumento de EROs (oxidantes totais avaliados com a sonda DCFH-DA) originários do RE em *C. albicans*, gerando peroxidação lipídica e danos associados. N-acetil-l-cisteína (NAC) preveniu a elevação dos níveis de EROs e os danos associados a ação antifúngica do CFW (NAC regenera GSH, que previne a formação das induzidas pelo antifúngico), demonstrando a dependência de EROs (principalmente o  $H_2O_2$ , como verificado em sistemas de hiperexpressão de *SOD1* e *CAT1* por um forte promotor de *ACT1*) para a ação destes disruptores de parede. Disfunção mitocondrial e, aumento de  $O_2^{\bullet-}$  a partir desta organela, não foram observadas. Além disso, os grupos tratados com CFW ou CasP com adição

de um quelante de ferro (2, 2'-bipiridina [BIP]) ou *scavenger* de HO• (etanol) ou efeito do CFW/CasP sobre cepas mutantes para este alvo (reação de Fenton) não atenuaram o EO e a consequente inibição do crescimento microbiano.

O aumento de EROs a partir do RE foi atribuído pelos autores a uma hiperexpressão gênica e indução de uma resposta via acúmulo de proteínas desdobradas (do inglês *unfold protein response* (UPR)), por conta da disrupção na parede fúngica. Isto se refletiu em um aumento na secreção de proteínas e consequente aumento da enzima oxidoreductina do RE (Ero1), relacionada ao dobramento oxidativo de proteínas, fazendo um rearranjo redox de pontes dissulfeto, como contrarresposta para superar o quadro de UPR ou de proteínas oxidadas encontradas em células tratadas com CFW ou CasP. Assim, durante sua função, Ero1 na forma redutiva recebe elétrons do O<sub>2</sub>, formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fazendo com que haja predominância da forma oxidada de Ero1 e, explicando, tanto este incremento em Ero1 oxidada, quanto os altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenientes do RE. Estes dados estabelecem um novo *link* entre a integridade da parede celular fúngica, função do RE e aumento de EROs e danos associados (aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa peroxidação lipídica, como evidenciado pelos autores), demonstrando também um possível no alvo terapêutico, com especificidade/seletividade para o fungo [24].

Em fungos, o O<sub>2</sub>• formado pode reagir instantaneamente com o •NO, gerando ONOO•. Este fato é comprovado em prévios trabalhos [4, 22, 23], que avaliaram estas ERNs ou a resposta antioxidante do fungo (por exemplo, via aumento na expressão persistente de *YHB1*, ou tardia de *TRR1*) frente à exposição a tais oxidantes [22]. Estes dados destacam a plausibilidade cronológica dos eventos relacionados ao EN na célula fúngica, desde que exposição ERNs geram uma resposta imediata e persistente via *YHB1*, e uma resposta tardia é verificada via aumento na expressão de tioredoxinas (gene *TRR1*), desde que esta classe de enzimas tenta controlar os danos oxidativos a proteínas (evento seguinte à exposição das biomoléculas as ERNs).

Ainda, segundo Cánovas *et al.* [23], o •NO endógeno de fungos pode ter origem em algumas rotas metabólicas, como a da arginina/poliaminas (mediado por enzimas com atividades similares a do óxido nítrico sintetase [NOS]) ou do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (ação do nitrato redutase, *niaD*). O •NO é detoxificado pelas rotas das flavohemoglobinas (*hemC*, *fhbA*, *fhbB*), do citocromo P450 NO redutase (*nicA*, *norA*, *norB*) ou da GSNO redutase (genes *GNO1* e *SEAI*). Esta ERN tem variadas funções em fungos, como a regulação do metabolismo do nitrogênio, morfogênese e reprodução.

Complementarmente, Ferreira *et al.* [4] mostraram que, o ONOO• é induzido em *Cryptococcus gattii* pela ação da AnB, em que associação de AnB com concentrações de até 50 µM de porfirinato de ferro III (um *scavenger* de ONOO•), atenuou os danos



associados ao EN. Os autores relataram que, no *C. gattii*, assim como em outros contextos químico-biológicos, o  $\bullet\text{NO}$  compete com a Sod pelo  $\text{O}_2\bullet$ , tendo cinética favorável, como demonstrado pela marcante formação de  $\text{ONOO}^-$  e pela paralela diminuição na atividade da Per (uma enzima que atua sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cujas concentrações diminuem como consequência da menor dismutação do  $\text{O}_2\bullet$  pela Sod).

Associado as fontes de EROs/ERNs na célula fúngica e, dependentes do contexto que permeia e as características físico-químicas dos oxidantes (difusão, meia vida, entre outros), normalmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa peroxidação lipídica (tem boa difusão, maior meia vida e atravessa membranas), ERNs (principalmente  $\text{ONOO}^-$ ) leva a oxidação proteica e o potente oxidante  $\text{HO}\bullet$  tem alta capacidade de alcançar o DNA e causar sérios danos oxidativos a esta biomolécula, explicando, em parte, o fato de alguns compostos, que serão adiante discutidos, terem a capacidade de induzir maiores níveis de determinado oxidante e consequentemente maiores danos a uma determinada biomolécula, o que também será diretamente proporcional ao aumento nas concentrações de tal oxidante.

### Sistemas de defesa antioxidante do fungo como marcadores da elevação de ERO/ERN

Seguindo a exposição as EROs e/o ERNs, a ativação de diversos sistemas de defesa antioxidante (tanto os constitutivos como os induzíveis), temporalmente, primeiro, permitem à célula fúngica detoxificar os oxidantes (através da Sod [detoxifica o  $\text{O}_2\bullet$ ], Cat e GPx [detoxificam o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ], entre outras), segundo, caso haja necessidade (em caso de EO ou EN), em reparar os danos oxidativos a biomoléculas (por exemplo, via tioredoxinas, regenerando proteínas oxidadas). A detoxificação e os reparos permitem a prevenção de maiores danos e evita possível morte celular fúngica. Para haver ação antifúngica, a indução de EROs/ERNs deve ser acompanhada de uma ineficiência destes sistemas de defesa antioxidante da célula fúngica. Vários sistemas específicos de defesa antioxidante têm sido destacados para fungos, alguns, controlados em *clusters* gênicos. Cabe salientar que, como ainda será visto nesta revisão, a estratégia de adição de antioxidantes exógenos, visando prevenir o EO/EN e provando o efeito de EROs/ERNs, não é discutido nesta seção.

Cepas mais virulentas de fungos podem apresentar marcante produção de enzimas do sistema antioxidante, como verificado por Lee *et al.* [26], que mostrou que cepas fúngicas que expressam mais o gene para Sod são menos afetadas pelo efeito de EROs induzidas pela radiação. Como implicação, isto foi refletido em uma ineficiência na ação irradiante para induzir um mecanismo fungicida associado. Outro exemplo, bem sucedido, de resposta antioxidante contendo danos oxidativos em fungos, foi demonstrado por Paul *et al.* [27], em que a resistência de *Cryptococcus neoformans* ao FLC foi correlacionada a hiperexpressão do *YAPI*, visto que mutação neste gene causou extrema hipersensibilidade do fungo ao EO e ao FLC, nas mesmas faixas de concen-

tração testadas para as o fungo com o *YAPI* funcional. Como foi demonstrado que *C. albicans* ou *Aspergillus fumigatus* deficientes de *YAPI* também são hipersensíveis ao EO, mas não ao FLC, foi sugerido que este gene apresenta um papel único na resposta de *C. neoformans* a este agente antifúngico.

Ainda, aumento na expressão gênica de enzimas do sistema de detoxificação de oxidantes nem sempre significa efetiva resposta do fungo. Guirao-Abad *et al.* [12] mostraram que a ação indutora de EROs/ERNs por AnB pode ser acompanhada de aumento na expressão dos genes que codificam Cat, glutathiona redutase (GR) e Sod, como parte da resposta antioxidante do fungo. Provavelmente, o desfecho fungicida promovido por AnB mostra que, embora exista aumento, este é ineficaz para o controle redox, prevalecendo os oxidantes no balanço oxidante-antioxidante. Este desequilíbrio redox culmina em danos oxidativos irreversíveis para o fungo, o qual também foi evidenciado por Ferreira *et al.* [4]. Os autores concluíram que o aumento na capacidade de defesa antioxidante (como aumento de Sod) de *C. gattii* pode não ser suficiente para conter os danos oxidativos induzidos por AnB ou ITC.

Rossignol *et al.* [28] demonstraram que cetonas sintetizadas pela reação de Mannich e derivados sintéticos (com CIM de 0, 8 a 6 µg/mL) podem elevar as EROs em espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*), e isto causar ativação do gene *CAP1* (um gene essencial na montagem da resposta antioxidante), em que tal resposta também não foi suficiente para impedir a atividade antifúngica destes compostos.

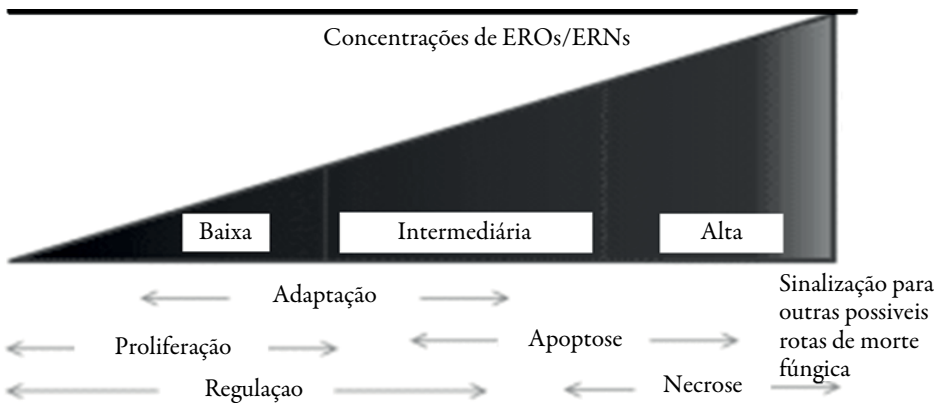
Portanto, os estudos aqui demonstrados, apresentam evidências de estresse oxidativo ou nitrosativo na célula fúngica, avaliadas sobre a luz de medidas indiretas das espécies oxidantes (através de sondas como a DCFH-DA, ou outros métodos/sondas), medidas dos danos induzidos por EROs e ou ERNs (peroxidação lipídica [níveis de MDA], oxidação proteica [avaliação de resíduos oxidados] ou danos ao DNA [avaliação de desoxiguanosina com 8-oxodG]). Além disso, a avaliação dos sistemas de defesa antioxidante do fungo, através de análises do perfil de transcrição ou atividades enzimáticas fornecem uma ferramenta valiosa para estabelecer o quadro de EO ou EN.

De relevância clínica, determinadas cepas fúngicas podem apresentar variados níveis de hiperexpressão dos sistemas de defesa antioxidante. Esta variação pode inclusive determinar o grau de virulência destas cepas *in vivo* bem como o perfil de sensibilidade aos antifúngicos que induzem EO/EN e, extensivamente, ao ataque de fagócitos. A hiperexpressão de genes/proteínas, relacionadas à resposta antioxidante pode favorecer o fungo frente ao ataque de fagócitos, os quais utilizam do EO/EN como mecanismo fungicida. Interessantemente, expressão diferencial para uma determinada enzima antioxidante, independentemente da predileção do oxidante induzido, pode ocorrer,

de modo que a enzima em concentrações excessivas pode detoxificar um determinado oxidante, mas favorecer acúmulo de outro. Por exemplo, hiperexpressão do gene para Sod concomitante a repressão de *CAT* pode favorecer acúmulo de  $H_2O_2$  na célula fúngica, caso contrário, uma repressão do gene *SOD* favoreceria o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ .

### Indução de EROs/ERNs pode levar a apoptose na célula fúngica

A sutileza do limiar entre o que é fisiológico e o que passa a ser patológico depende de complexos fatores e, a dualidade dos oxidantes é destacada, sendo o contexto redox sempre passível de alterações que podem significar grandes alterações funcionais [29]. A figura 3 mostra o sutil limiar entre o fisiológico e patológico, frente às diferentes concentrações de EROs/ERNs.



**Figura 3.** Limiar entre as concentrações de EROs/ERNs em fungos e a ativação de importantes eventos funcionais sinalizados por estes oxidantes.

Baseado neste contexto, estudos tem demonstrado que ligeira elevação destes oxidantes (a partir de valores intermediários) é importante fator de sinalização e precede a apoptose em fungos, por diferentes rotas (com diferentes mediadores, expressão gênica e danos citolíticos associados) para que este evento ocorra (dependentes dos níveis de determinados oxidantes e interação com componentes chaves que levam a apoptose). Dessa forma, este evento pode fornecer um possível alvo terapêutico, desde que haja especificidade/seletividade para o fungo em questão, uma vez que alguns componentes destas vias são comuns em humanos [30-34]. Assim, em fungos, o aumento de EROs/ERNs tem sido considerado um fidedigno marcador de apoptose e, portanto, um importante alvo farmacológico.

Notoriamente, existem outras vias de acionamento de apoptose em fungos que são independentes de EROs [33]. Excessivas concentrações de EROs podem sinalizar

outros mecanismos de morte, além de apoptose, tais como a necrose na célula fúngica (também referida como necrose programada) [33]. Na necrose programada, são observados danos oxidativos mais acentuados, com marcante aumento de volume das organelas, intensos danos e perda de integridade de biomoléculas e membranas e uma randômica fragmentação do DNA. Estes mecanismos são mostrados na figura 4.

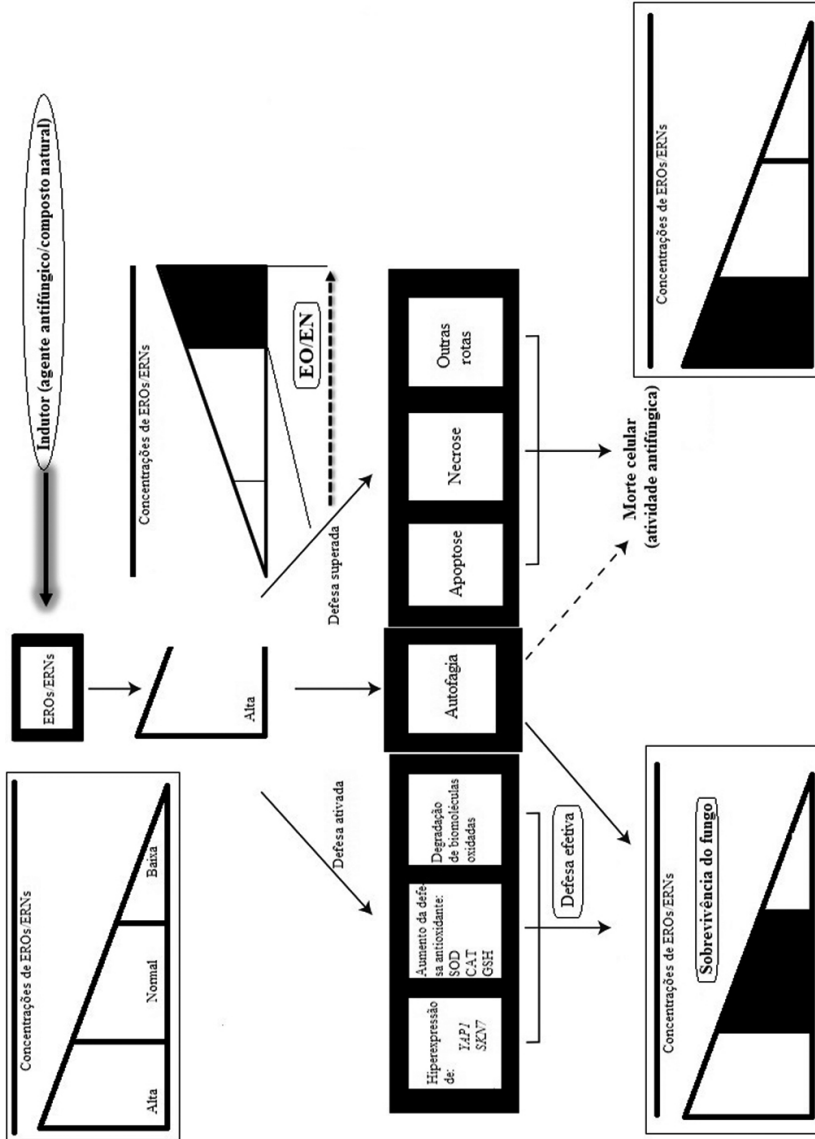
Neste contexto, mecanismos que possam elevar estas concentrações de EROs pró-apoptóticas e causar efeito fungicida contra células planctônicas e biofilmes, são alvos de estudo. Estes estudos não são apenas restritos à busca por novos compostos, mas têm sido descritos para antifúngicos já usados na terapêutica, tais como AnB a baixas doses fungicidas (0.25–1 µg/ml), ITC e equinocandinas, contra fungos de relevância médica (como *C. albicans*).

Dessa forma, AnB pode causar alterações nos níveis de ATP, e outras alterações típicas de apoptose, em sub-populações de *C. albicans*, sustentando o fato que o tratamento de infecções sistêmicas causadas por este microrganismo, com concentrações não ajustadas deste agente antifúngico, diminui a população microbiana via indução de apoptose. *A. fumigatus* tratado com 0.25–1 µg/ml de AnB apresenta coloração positiva com *annexin V*, indicando exposição de fosfatidilserina, um marcador clássico de apoptose, sendo também evidenciado fragmentação do DNA, conforme verificado pelo teste do Túnel [30-35].

Ainda segundo Ramsdale [30], as fenantrolinas podem induzir a morte de *C. albicans* com marcante elevação nos níveis de EROs não acompanhado por danos ao DNA, o que poderia indicar que este aumento dos oxidantes toma parte, preferencialmente e primariamente, na sinalização de apoptose.

Alguns compostos, que serão discutidos mais adiante, demonstraram induzir apoptose em fungos via aumento de EROs, incluindo a metergolina (um alcaloide da classe das ergolinas que apresenta ação antagonista serotoninérgica a nível de receptores do sistema nervoso autônomo) [36] que pode induzir apoptose em *C. krusei*, os esfingóides em *A. nidulans* [37], o (+)-medioresinol [38], a baicaleína [39], o *plagiochin E* [40, 41], a amentoflavona [42] e *styraxjaponoside C* [43] em *C. albicans*. O perilaldeído [PAE], a curcumina e o ácido úsnico serão discutidos mais adiante.

Alguns outros compostos naturais, com estruturas mais complexas, que poderiam levar a apoptose na célula fúngica por incrementar EROs, incluem: proteína osmotina (isolado do tabaco) [30], defensinas de plantas como RsAFP2 (*Heuchera sanguinea*) e PvD1 (*Phaseolus vulgaris*) [44, 45], peptídeos antimicrobianos proveniente de plantas, artrópodes e animais entre outros, como *psacothasin* (proveniente de *Psacothea hilaris*) [46], arenicina-1 (*Arenicola marina*) [47], *pleurocidin* (*Pleuronectes americanus*)



**Figura 4.** Possíveis respostas do fungo as altas concentrações de EROs/ERNs.

O acúmulo de ERO ou ERNs pode elicitar uma variada gama de defesa endógena do fungo, incluindo os sistemas de defesa antioxidante (para detoxificar oxidantes ou reparar biomoléculas), os de degradação de biomoléculas afetadas (sistema proteossomo dependente de ubiquitina) e finalmente, a autofagia. Contudo, quando tais sistemas de defesa falham, a célula fúngica pode sofrer as consequências do acúmulo de EROs ou ERNs, culminando em EO ou EN e, conseqüentemente, entrando em apoptose, ou sofrendo necrose ou outros tipos de morte (efeito antifúngico pela indução de EROs/ERNs).

[48], papiliocina (*Papilio xuthus*) [49], e melitina (*Apis mellifera*) e [50], fatores salivares de humanos, incluindo as lactoferrinas [51] e as histatinas (apesar das controvérsias sobre este polipeptídeo) [30, 52, 53].

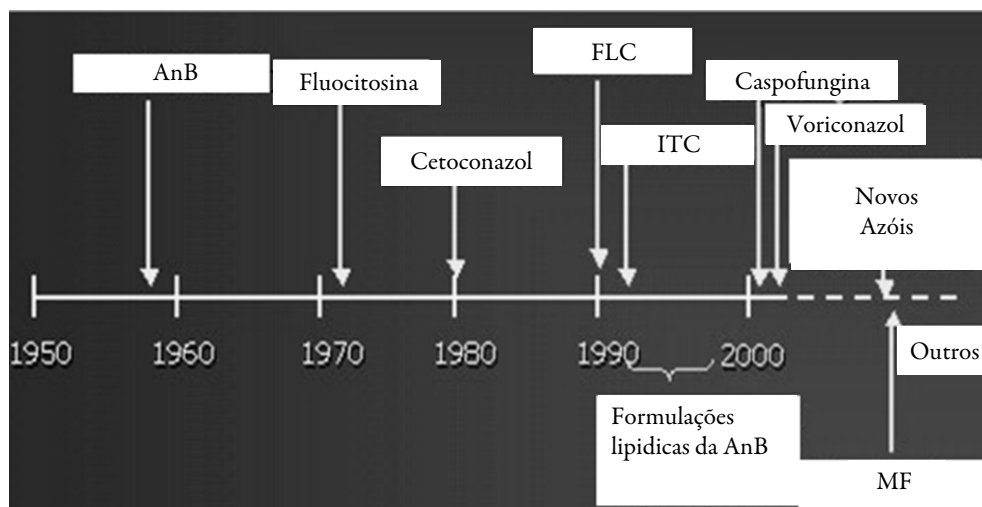
Em estudo demonstrando a intrincada relação entre EROs e apoptose, Silva *et al.* mostraram que, o sinergismo entre o FLC e os compostos antioxidantes naturais: catequina, quercetina ou epigallocatequina, induziu apoptose em *C. tropicalis* resistente ao FLC [54]. Interessantemente, com o uso de um antioxidante a baixas concentrações ou concentrações em que estes compostos se comportem puramente como um “antioxidante” em um meio celular, seria esperado a diminuição de EROs induzida por FLC, e uma não ativação do apoptose, como tem sido reportado na literatura, que evidenciam a capacidade de antioxidantes em abolir o efeito microbicida dependente de EROs/ERNs. Esta situação leva ao desfecho clínico desfavorável ao hospedeiro quando a associação antifúngico + antioxidante é adotada durante o tratamento de infecções fúngicas [14, 15, 18, 19, 24].

Contudo, como é também amplamente destacado na literatura, antioxidantes a altas concentrações ou associados a outros fatores, como o contexto do ciclo redox na célula, podem apresentar um efeito pró-oxidante [25, 55]. O efeito pro-oxidante é visto no estudo de Silva *et al.*, o qual utilizou altas concentrações de flavonoides (128 µg/ml), tendo como desfecho a morte celular programada do fungo. Ainda quanto a ação do FLC, Liu *et al* demonstram que a adição de Farnesol exógeno (um correlato a via de biosíntese do ergosterol) pode elevar as EROs e causar apoptose em *Penicillium expansum*, um fungo patógeno de vegetais [56].

Gaofua *et al.* demonstraram que um lipopeptídeo surfactante, WH1 fungina, proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*, a baixas concentrações de 25-50 µg/mL, pode provocar apoptose em fungos (*C. albicans* e *Rhizoctonia solani*) sinalizada por rotas dependentes da mitocôndria com marcante formação de ERO (em contraste, altas concentrações, 100 µg/mL, leva a formação de poros na membrana e consequente necrose) [57]. Clássicos marcadores de apoptose foram evidenciados após o tratamento com 25-50 µg/mL de WH1 fungina, incluindo desprendimento de citocromo *c* da mitocôndria (um dos fatores da atividade da metacaspase 9 para sinalizar apoptose) e marcante elevação dos níveis pró-apoptóticos de EROs (avaliadas com DCFH-DA que detecta todas as EROs), precedendo a morte celular fúngica. Outros peptídeos sintéticos também têm sido reportados como causadores de apoptose em fungos [58].

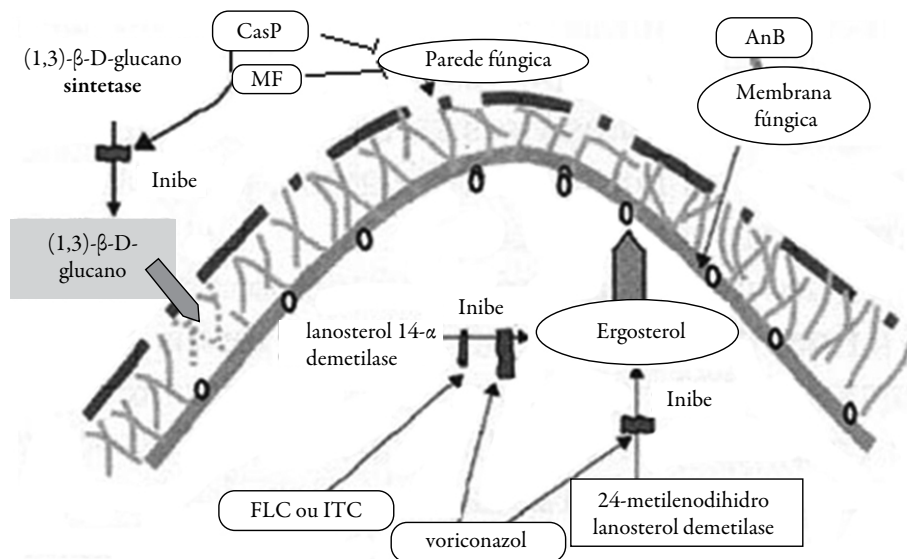
### Indução de EROs/ERNs como parte da ação de fármacos antifúngicos

Diante das atuais altas incidências de doenças infecciosas causadas por fungos, os antifúngicos clássicos, pertencentes às classes dos polienos (principalmente AnB e suas formulações lipídicas), azóis (FLC, MN, voriconazol e ITC) e equinocandinas (MF), continuam sendo rotineiramente utilizados na prática clínica, (figura 5). O espectro de ação destes agentes terapêuticos tem variado significativamente nos últimos anos, por conta das altas taxas de resistência em fungos. Devido à diminuição de cepas sensíveis a estes clássicos antifúngicos, houve aumento no número de estudos e publicações quanto à busca de novas alternativas terapêuticas ou compostos em fontes sintéticas ou naturais, em anos recentes, como visto nas figuras 1 e 2.



**Figura 5.** Histórico da descoberta e introdução de agentes antifúngicos na terapêutica.

As atividades destes agentes antifúngicos clássicos, já utilizados na terapêutica, são reivindicadas como sendo também dependentes da prévia produção de EROs/ERNs, como desfecho oriundo das atividades principais, classicamente descritas e vistas na figura 6 e tabela 3, ou como um novo mecanismo paralelo a tais atividades. O desfecho pode ser um mecanismo de ação “fungicida”, preferivelmente ao “fungistático”, no chamado “mecanismo unificado para a morte microbiana” (como visto na tabela 3). Este fato é comprovado mediante a atenuação de danos oxidativos e prevenção da morte microbiana induzida por EO/EN pela adição de antioxidantes exógenos ou intenso acionamento de sistemas endógenos de defesa antioxidante [59-61].



**Figura 6.** Alvos na célula fúngica para a ação dos polienos, equinocandinas e azóis.

Recentemente, Belenky *et al.* demonstraram através de estudos metabolômicos que, em *C. albicans*, AnB, MN e ciclopirox induziram marcantes alterações da dinâmica mitocondrial e perfil funcional, em parte, pela marcante produção dos EROs. O aumento na produção de EROs resultou em danos ao DNA e consequente morte microbiana [19]. Xu *et al.* conduziram estudos proteômicos para a elucidação de possíveis mecanismos indutores de EROs pelo FLC, na argumentação deste agente antifúngico induzir EO e um efeito fungicida [62].

O primeiro artigo reportando dados a respeito da indução de EROs como parte da ação antifúngica foi de 1986 [63], em que Sokol-Anderson *et al.* mostraram que AnB induzia danos oxidativos associado ao afeito fungistático contra *C. albicans*. Sangalli-Leite *et al.* demonstraram que a AnB exerce efeito fungicida contra *C. neoformans* através de forte indução de EROs [64].

Ainda para a AnB, Ferreira *et al.* demonstraram que este agente antifúngico pode levar a produção de EROs e ONOO<sup>-</sup> contra *C. gattii* [4], em um mecanismo paralelo a inibição da biossíntese de ergosterol. Este mesmo efeito também foi demonstrado pelos autores, durante o mecanismo de ação do FLC ou ITC. Interessantemente, apenas ITC e AnB provocaram peroxidação lipídica em *C. gattii*, devido ao prévio EO, induzido pelos antifúngicos (EROs induzidos pelo ITC ou EROs e ERNs [ONOO<sup>-</sup>] pela AnB), com ativação do sistema antioxidante do fungo. Neste caso,



a ativação do sistema antioxidante do fungo, foi ineficaz para conter os danos oxidativos. Os autores concluíram que AnB e ITC causam EO em *C. gattii* como parte de seus mecanismos antifúngicos.

Na sequência, Guirao-Abad *et al.* [12] encontraram que AnB e MF tomam parte na formação de EROs e que este evento é crucial durante suas atividades fungicidas. AnB (Concentração Inibitória Mínima [CIM] de 0, 5-1  $\mu\text{g/ml}$ ) induziu marcante formação de EROs em *C. albicans* SC5314 acompanhada de morte celular. Uma sutil formação de EROs induzida por MF foi observado em *C. albicans*, culminando em uma ação fungicida. Interessantemente, pré-incubação de *C. albicans* com tiouréia (um antioxidante) suprimiu os efeitos tanto de AnB como de MF, demonstrado por marcante viabilidade celular. Ainda, este estudo demonstrou que durante a ação de AnB ou MF, houve uma marcante ativação de três enzimas antioxidantes, a Cat, GR e Sod. Entretanto, a ativação das enzimas antioxidantes foi ineficiente para conter o intenso EO induzido por AnB. Sutis aumentos de trealose e do potencial de membrana mitocondrial foram também evidenciados em *C. albicans*, durante o tratamento com AnB.

Contrastando com estes achados para MF, como aqui já discutido, Yu *et al.* [24] mostraram que EROs (principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são induzidos por outro antifúngico da classe das equinocandinas, a CasP, contra *C. albicans*, mas de origem no RE. Estas diferenças entre estudos podem estar relacionadas às diferentes metodologias adotadas para avaliar as EROs, visto que o efeito fungicida associado foi verificado nos dois casos [12, 24]. Estes achados são complementares aos de Hao *et al.* [65], que demonstraram que a CasP pode conduzir a apoptose ou necrose em *C. albicans*, provavelmente, por induzir uma sutil elevação (causando apoptose) ou marcante elevação (causando necrose) nos níveis de EROs.

Em 2002, Kobayashi *et al.* relataram sobre a indução de EROs pelo MN [10]. Este agente antifúngico (com CIM de 0, 125 a 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) induziu intensa formação de EROs em isolados clínicos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*), em um modo dependente da concentração. Pré-tratamento com 10  $\mu\text{M}$  do antioxidante pirrolidinaditiocarbamato (PDTC) inibiu o mecanismo antifúngico associado à produção de EROs. Os autores também sugeriram que FLC eleva a produção de oxidantes em *Candida* e isto pode estar relacionado à sua ação antifúngica.

Complementando os estudos de Kobayashi *et al* e Ferreira *et al.* [4, 10], Mahl *et al.* [6] mostraram que como parte do mecanismo principal o FLC pode induzir a formação de EROs em *C. glabrata* e consequente danos ao DNA (a peroxidação lipídica e oxidação proteica não foram significativas neste caso, como relatado pelos autores).

**Tabela 3.** Clássicos antifúngicos que geram EROs/ERNs como parte de seus mecanismos de ação.

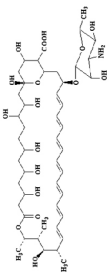
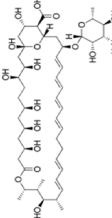
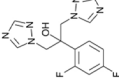
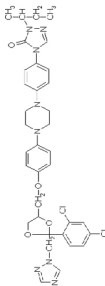
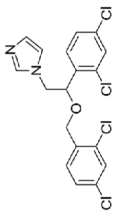
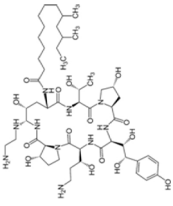
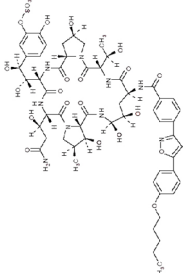
Antifúngico/ Classe	Estrutura	Alvo primário*	Ação	Indução de EROs/ERNs	Desfecho	Refs.
AnB/ Polienos		Membranas	Liga-se ao ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA <sup>A</sup> ) e ERNs (avaliadas com dihidrorodamina) em: <i>C. gattii</i> ; Indução de EROs em: <i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i> <i>C. neoformans</i> Indução de EROs e apoptose em biofilmes de: <i>C. albicans</i>	Em baixas doses, indução de apoptose sinalizada por EROs; marcante indução de EROs/ERNs que pode desencadear o efeito fungicida via um incremento de peroxidação lipídica em <i>C. gattii</i> . Provável fonte mitocondrial das EROs.	[4, 12, 30, 62, 63, 64]
Nistatina		Membranas	Liga-se ao ergosterol	Indução de EROs contra: <i>C. albicans</i>	Indução de EROs pode desencadear o apoptose e o efeito fungicida associado.	[4, 30]
FLC/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA) em: <i>C. gattii</i> <i>C. neoformans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i>	Danos ao DNA <sup>B</sup> induzido por EROs; Efeito fungicida associado (dependente de tempo e concentração) <sup>(6),70</sup> ; Indução de apoptose. <sup>35</sup> A elevação de EROs em <i>C. neoformans</i> é controlado pelo sistema antioxidante do fungo.	[4, 27, 54, 62, 66]
ITC/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs em: <i>C. gattii</i> ,	Ligeira disfunção mitocondrial, indicando a possível fonte das EROs.	[4]

Tabela 3. (Continuação.)

Antifúngico/ Classe	Estrutura	Alvo primário*	Ação	Indução de EROs/ERNs	Desfecho	Refs.
MN/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA) em: <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> Contra biofilmes de <i>C. albicans</i> , altas doses (>1 mM) de MN induz um padrão funcional bifásico, provavelmente devido à resistência induzida por aumento de defesas antioxidantes.	Indução de EROs com alteração da dinâmica mitocondrial, demonstrando ser esta organela a provável fonte dos oxidantes. Evidências de danos oxidativos ao DNA associados ao efeito antifúngico. Efeito sobre o estresse oxidativo via aumento de O <sub>2</sub> <sup>•</sup> contra biofilmes de <i>C. albicans</i> .	[10, 19, 67]
Casp/ Equinocandinas		Parede celular	Inibe a síntese de glucano	Indução de EROs em: <i>C. albicans</i> Atividade contra biofilmes a altas concentrações.	EROs originárias no RE. Gera peroxidação lipídica; Intensificação dos danos associados à perda de parede.	[24]
MF/ Equinocandinas		Parede celular	Inibe a síntese de glucano	Indução de EROs em: <i>C. albicans</i>	Sutil elevação de EROs acompanhada de um efeito antifúngico.	[12]

<sup>A</sup>DCFH-DA: Não apresenta especificidade, avaliando todas as EROs (O<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e HO<sup>•</sup>) com variados graus de seletividade; <sup>B</sup>Os danos ao DNA encontrados pode também se correlacionar a uma maior formação de HO<sup>•</sup> (como já discutido), desde que os estudos têm encontrado menores concentrações de outras EROs. Refs.: Referências. As estruturas químicas representadas foram retiradas do CAS, ou dos artigos aqui referenciados (entre parêntesis) ou desenhadas com auxílio do ACD/Labs (*Advanced Chemistry Development Inc., version 6.0*)

Paralelamente, foi encontrado um aumento na atividade de GPx, Sod e glutathione-S transferase (GST), demonstrando a plausibilidade do incremento de EROs correlacionada ao efeito deste agente antifúngico.

Ainda para o FLC, Yan *et al.* mostraram que existe uma via mitocondrial com uma oxidase alternativa em *C. albicans*, cuja ativação visa a defesa do microrganismo contra os danos oxidativos induzidos por este agente antifúngico, portanto, diminuindo a susceptibilidade de *C. albicans* ao FLC [66]. Em relação aos outros azóis, Thevissen *et al.* [67] mostraram a participação de EROs na ação do MN. Rubio *et al.* relataram possível efeito fungicida do voriconazol associado ao EO [68].

Cabe ressaltar que é atribuído ao FLC, a princípio, uma ação fungistática *in vivo*, contribuindo com diminuição parcial da carga microbiana e consequentemente facilitando a erradicação do foco infeccioso pelo sistema imune do hospedeiro [69, 70]. Contudo, diferentes estudos têm demonstrado que prolongados tratamentos ou altas concentrações ou doses com este azól conduz à atividade fungicida. *In vitro*, foi demonstrado que a diminuição no número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. albicans* a partir de 24 horas é crescente e, atinge um ápice em torno de 7 dias de exposição a 1 µg/mL de FLC [69]. *In vivo*, uma dose deste azól de 10 mg/kg/dia por 12 semanas pode erradicar a carga microbiana, comparada ao controle não tratado com FLC [70]. Estes achados são condizentes com danos oxidativos requerendo um mais longo prazo, promovidos por EROs/ERNs, o que, ao menos em parte, poderia explicar este efeito fungicida a longo prazo do FLC.

### **Novos candidatos a agentes antifúngicos com mecanismos de ação que induzem o acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica**

Como observado por Zida *et al.* [71], as pesquisas por novos antifúngicos, principalmente para substâncias com atividade anti-*C. albicans*, cresceram substancialmente desde 1966, pois a resistência fúngica vem crescendo cada vez mais e, se torna um desafio para o tratamento. Em hospitais é vista a necessidade de administração de doses elevadas de antifúngicos, o que aumenta o risco de toxicidade por estes fármacos. Diferentes estudos abordam a problemática que permeia a busca por novos antifúngicos e possíveis soluções para o problema, como a associação sinérgica entre os antifúngicos atuais e novos compostos, principalmente aqueles provenientes de fontes naturais [72-74].

Os compostos de fonte natural (resumidos na tabela 4), inclusive aqueles que já apresentam algum uso na medicina popular, são potenciais candidatos como agente antifúngico (baixas CIMs ou CFMs). Estes compostos apresentam mecanismo de ação, ao menos em parte, relacionados à indução de um EO na célula fúngica, que demonstra ser um novo alvo terapêutico com menores propensões à resistência microbiana.

Como exemplos, o ácido úsnico é um composto de ocorrência natural que tem sido utilizado para uma variedade de finalidades terapêuticas, sendo que, recentemente, seu potencial antifúngico foi reportado (como será discutido na seção perspectivas) [75]. Como outro exemplo, Tian *et al.* [7] demonstraram que um perilaldeído (PAE), proveniente de *Perilla frutescens*, apresentou CIM de 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  contra *C. albicans*. O mecanismo de ação antifúngico foi demonstrado ser dependente de uma elevação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e um acúmulo de EROs, de provável origem mitocondrial. Eventos característicos de apoptose foram observados, como disrupção do potencial de membrana mitocondrial, externalização de fosfatidilserina e desprendimento de citocromo *c*. Ainda, um padrão característico de fragmentação nuclear e danos ao DNA confirmou a indução de apoptose mediada por EO induzido por PAE.

Khan *et al.* [5] demonstraram que o eugenol ( $\text{CIM}_{90} = 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), metil eugenol ( $\text{CIM}_{90} = 350 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e estragol ( $\text{CIM}_{90} = 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), três fenilpropanóides provenientes de óleos essenciais, causam EO em *C. albicans* (ATCC 90028) culminando em peroxidação lipídica e consequente desarranjo da membrana fúngica com desfecho em morte celular. A peroxidação lipídica aumentou até 4 vezes na presença de concentrações que variaram de 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  destes compostos, sendo que a sequência da capacidade oxidante foi: metil eugenol > eugenol > estragol. O incremento nos sistemas de defesa antioxidante de *C. albicans*, como demonstrado pelos autores, foi ineficiente para controlar os danos oxidativos.

De acordo com Wang & Shen [8], o honokiol, um composto isolado de algumas plantas do gênero *Magnolia*, provou exercer ação antifúngica contra *Schizosaccharomyces pombe*, com atividade dependente da concentração (0–8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e relacionada à produção de EROs. Este estudo também demonstrou que 512 genes são hiperexpressos e 42 hipoexpressos, sendo que, entre os hiperexpressos, 45% pertencem aos sistemas de defesa antioxidante do fungo.

Interessantemente, Liou *et al.* [76] demonstraram que, *in vitro*, concentrações de 0,1–10  $\mu\text{M}$  de honokiol inibiram o *burst* oxidativo de neutrófilos de rato, causando marcante diminuição de EROs induzidas por acetato miristato de forbol (PMA, 20 nM) ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, 1  $\mu\text{M}$ ). Este é um exemplo de efeito contrário a elevação dos níveis de EROs em fagócitos que é atribuído ao honokiol, contrastando com o efeito pró-oxidante (aumentando os níveis de EROs) exercidos na célula fúngica. Esta dualidade na ação deste composto, independente do seu *status* redox, pode ser atribuída, ao menos em parte, as diferentes concentrações usadas nestes estudos. Além disso, foi demonstrado no mesmo estudo que o honokiol (0,1–10  $\mu\text{M}$ ) impede o influxo de cálcio induzido por tapsigargina (um composto que acelera a montagem dos componentes de Nox2), portanto, também se constituindo como uma

**Tabela 4.** Compostos de ocorrência natural com atividade antifúngica e mecanismo de ação dependente do acúmulo de EROs ou ERNs endógenos.

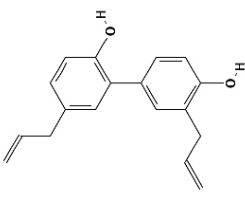
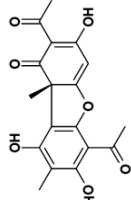
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Honokiol [8]		Bifenil Neolig- nano	Gênero <i>Magnolia</i>	<i>S. pombe</i>	8 µg/ml	Evidências <i>in vitro</i> para uma dependência de EROs. Evidência de um estresse oxidativo como avaliado por um amplo perfil de expressão gênica dos sistemas antioxidantes no fungo.	Aprovado pelo FDA; Utilizado em xampus, cremes dentais e desodorantes; alta biodisponibilidade; amplo uso na medicina popular, com várias bioatividades descritas (incluindo a antioxidante), com uma complexidade de mecanismos associados, dependentes do modelo experimental de doença; pode ser hepatotóxico (acima de 100 µM)
Ácido úsnico [75]		Derivado Dibenzo- furano	Espécies de <i>Lichens*</i> ; Gênero <i>Usnea</i>	<i>C. albicans</i>	4 µg/ml	Dependente de EROs (avaliadas com NBT ou DCFH-DA) / ERNs (avaliadas com reagente de Griess e NaNO <sub>2</sub> <sup>B</sup> ). Modelo <i>in vitro</i>	Comercializado nos EU como suplemento alimentar (Formulações aprovadas pelo FDA); pode ser hepatotóxico (Ingestão diária de 300–1350 mg por semanas); Gênero <i>Usnea</i> amplamente utilizado na medicina tradicional; Ação do ácido úsnico sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> pré-formado. O ácido úsnico apresenta as atividades antimicrobiana, antiviral, antiprotzoária e antioxidante.

Tabela 4. (Continuação)

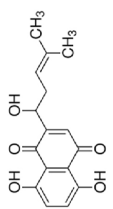
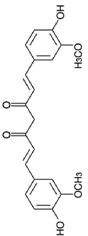
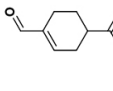
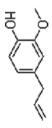
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Shikonina (SK) [79]		Derivado Naftoquinonico	<i>Alkanna tinctoria</i> ; <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc	<i>C. albicans</i>	CIM <sub>80</sub> 4 µg/ml	Evidências <i>in vitro</i> para uma dependência de ERNs (avaliadas com 5 µM da sonda DAF-FM DA); Acúmulo de •NO na célula fúngica correlaciona-se com o efeito antifúngico.	Aprovado pelo FDA. SK induz apoptose via aumento de EROs. Apresenta ação anti-inflamatória (via inibição de proteassomas) e antioxidante; SK pode ser até 16 vezes mais efetivo que o FLC contra isolados de <i>C. albicans</i> resistentes.
Curcumina [9]		Polifenol	<i>Curcuma longa</i> Linn	Espécies de <i>Candida</i> (incluindo isolados clínicos resistentes)	37-370 mg/l	Dependente de EROs totais (avaliadas com DCFH-DA); conduz a apoptose (ação fungicida). Modelo <i>in vivo</i> . Sinergismo com políenos ou azóis promove um efeito fungicida mais intenso via acúmulo de EROs.	Embora haja consumo de <i>C. longa</i> , existem controvérsias sobre o uso deste composto <i>in vivo</i> . Também atua sobre TUP1, paralelamente, inibindo o desenvolvimento de hifas. Diversos estudos em modelos animais. A curcumina é conhecida pelo seu efeito antioxidante.
Perilaldeído [7]		Perilaldeído	Perilla**	<i>C. albicans</i>	0, 4 µl/ml	Dependente de EROs total (avaliados com DCFH-DA); Eleva o Ca <sup>2+</sup> intracelular; Gera apoptose (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; Utilizado em perfumes, adoçante.
Eugenol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	500 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto vastamente usado em odontologia em associação com materiais reparadores. É um antipolimerizante e antioxidante.

Tabela 4. (Continuação)



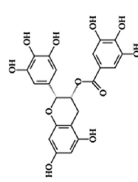
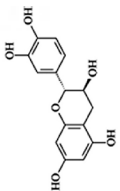
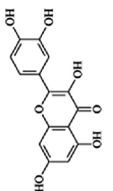
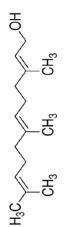
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Metil- eugenol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	350 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto correlato ao eugenol. É um antipolimerizante e antioxidante.
Estragol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	200 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto correlato ao eugenol. É um antipolimerizante e antioxidante.
Epigallocatequina [54]		Flavonoides	Chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Catequina [54]		Flavonoides	<i>Camellia sinensis</i> , chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Quercetina [54]		Flavonoides	Chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Farnesol [56]		Alcool sesquiterpênico	Óleos essenciais ***	<i>P. expansum</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>A. nidulans</i>	10 – 100 µM	Ação fungicida dependente de EROs; Apoptose devido à interrupção da homeostase redox no fungo.	Importante composto em fungos. Possui ação de geração de antioxidantes (e.g., GSH).



Tabela 4. (Continuação)

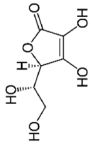
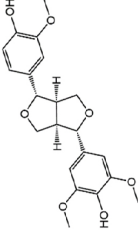
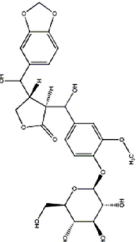
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc./ CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Ácido ascórbico [25]			Frutas cítricas (Limão, laranja)	<i>C. albicans</i>	90 mM	EROs (HO• gerados na reação de Fenton e avaliados pela sonda HPF, e <i>status</i> redox verificado por autofluorescência de flavoproteínas e NADH)	A Vitamina C tem amplo uso medicinal. Presente em vários alimentos.
(+)-Medioresinol [38]		Lignano-furfurano	Caula de <i>Sambucus williamsii</i> ; Sementes de abóbora; Famílias: Acanthaceae, Actinidiaceae, Apocynaceae, Celastraceae, Lauraceae, Magnoliaceae, entre outras.	<i>C. albicans</i>	CIM = 25 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DHR-123), que é um dos principais fatores de apoptose em fungos, foi também relacionado à ativação da via com marcadores clássicos deste desfecho bioquímico conduzindo ao efeito fungicida associado. EROs associados a danos ao DNA (método do Tunnel) e possível efeito fungicida (apesar de apenas a CIM ter sido investigado). Mitocôndria é a possível fonte de EROs.	<i>S. williamsii</i> é amplamente usada na medicina tradicional.
<i>Styraxjaponoside C</i> [43]		Neolignano glicosídico	Caula de <i>Styrax japonica</i>	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	CIM = 40 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DHR-123) sinaliza para apoptose associado ao efeito fungicida.	Composto identificado recentemente com promissoras bioatividades. É formado enzimaticamente pela dimerização de dois fenilpropanóides.

Tabela 4. (Continuação)

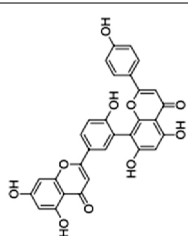
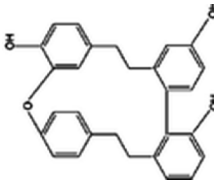
Composto/Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc./CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Amentoflavona [42]		Biflavonoides	<i>Selaginella tamariscina</i>	<i>C. albicans</i>	10 µM	A disfunção mitocondrial indica ser esta organela a fonte de EROs totais (avaliadas com DHR-123), que acumulados sinalizam a apoptose via mitocôndrias (com ativação de metacaspase, acúmulo de EROs, externalização de fosfatidilserina e danos ao DNA e fragmentação nuclear). Especificamente, um aumento de radicais hidroxilas (avaliados com a sonda HPF) foi observado, sendo prevenido com toureia.	Normalmente é um antioxidante.
<i>Plagiobin E</i> [40, 41]		Bis (bibenzil) macroclicico	<i>Marchantia polymorpha</i> L. (Marchantiaceae)	<i>C. albicans</i>	CFM = 64 µg/ml CIM = 16 µg/ml (Efeito fungistático)	A disfunção mitocondrial indica ser esta organela a fonte de EROs (avaliadas usando DCFHDA), que acumulados sinalizam a apoptose por uma rota dependente de metacaspase. EROs estavam elevadas em um modo dependente da concentração (8-64 µg/ml).	Diferentes bioatividades são atribuídas ao <i>Plagiobin E</i> , incluindo antioxidante, antibacteriana, antiviral e citotóxica.

Tabela 4. (Continuação)

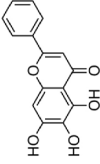


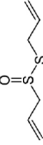
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Baicaleina [39]		Flavonas	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>C. albicans</i>	4 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DCFH-DA) sinaliza para apoptose associado ao efeito fungicida. Via acionada é independente de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e dependente de outras EROs, visto que baicaleina inibe a apoptose induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Disfunção mitocondrial com elevação de EROs.	Amplio uso de <i>S. baicalensis</i> na Medicina tradicional. A classe das flavonas apresenta reconhecidas propriedades antioxidantes.
D-eritro Dihidro- fingosina [37]		Esfingóides (Esfingolipídios)	Espécies de fungos	<i>A. nidulans</i> (incluindo cepas mutantes)	2, 5 µg/ml	Aumento de EROs foi evidenciado pelo tratamento com este esfingóide, mas os oxidantes não sinalizaram para apoptose.	Molécula altamente bioativa.
Fitoesfingosina [37]		Esfingóides (Esfingolipídios)	Espécies de fungos	<i>A. nidulans</i> (incluindo cepas mutantes)	2, 5 µg/ml	Aumento de EROs foi evidenciado pelo tratamento com este esfingóide, mas os oxidantes não sinalizaram para apoptose.	Molécula altamente bioativa.
Alicina [81]		Dialil tio-sulfinato	Família Alliaceae (Ex. <i>Allium sativum</i> )	<i>C. albicans</i>		Sinergismo com AnB aumenta EROs sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	Uso medicinal com diversas propostas.

Tabela 4. (Continuação)

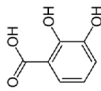
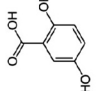
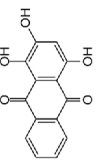
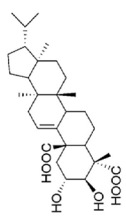
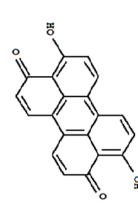
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
2, 3 DHBA [82]		Dihidroxibenzoídeos	Óleos voláteis de baunilha e amêndoas.	<i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i>	CFM = 6, 4	Depleção dos sistemas de defesa antioxidante conduziu ao ERO, sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	Sinergismo com AnB depleta os sistemas de defesa antioxidante, incluindo o tripeptídeo GSH, além de afetar a transcrição de alguns genes: <i>GLR1</i> [GR], <i>YCF1</i> [Glutratona S-conjugado a bomba], <i>TRX2</i> [Tioredoxina], <i>GSH1</i> [g-glutamilmilcisteína sintetase], <i>SOD1D</i> [Sod citosólica], <i>SOD2D</i> [Sod mitocondrial, Mn-Sod], <i>GLR1D</i> [Glutratona redutase].
2, 5 DHBA [82]		Dihidroxibenzoídeos	Óleos voláteis de baunilha e amêndoas.	<i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i>	CFM <sup>C</sup> = 3, 4 e 6, 4 mM	Depleção dos sistemas de defesa antioxidante conduziu ao ERO, sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	
Purpurina [31]		Antraquinonas	<i>Rubia tinctorum</i> L	<i>C. dubliniensis</i> (Biofilmes)	1-10 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DCFDA) dependente da concentração e sinaliza para apoptose via acionamento de metacaspases, associado ao efeito antibiofilmes (sobre a formação [preventivo] e sobre biofilmes maduros).	Biofilmes de <i>C. dubliniensis</i> tem sido identificado em fungemias e na superfície de diferentes biomateriais.

Tabela 4. (Continuação)

Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Ácido Retigerico B [72]		Ácido triterpênico	Espécies de <i>Lichens</i>	<i>C. albicans</i>	CIM = 8 µg/ml	Acúmulo de EROs (avaliadas com DCFHDA) na célula fúngica é dependente do tempo e concentração (4-64 µg/ml), com disfunção mitocondrial (provável fonte das EROs) e diminuição intracelular de cAMP. Danos oxidativos atenuados pelo tratamento com NAC.	
Perilenequinonas [74]		Perilenequinonas	Metabólito secundário de bactérias, fungos endofíticos.	Diferentes fungos		Composto induz EROs, e este aumento é incrementado na presença de luz (composto fotossensibilizante). EROs conduzem ao efeito fungicida associado.	

\*Também observado em outras poucas espécies não *Lichens* de ascomicetos

\*\*Família *Lamiaceae*, também encontrado em uma variedade de outras plantas (incluindo óleos essenciais);

\*\*\*Da flor de tília, óleo de grãos de almiscar, óleo de neroli e óleo de petigrain, entre outros.

<sup>A</sup>Na maior parte dos casos, esta é a concentração que induziu EROs/ERNs mais intensamente, em raros casos, os valores foram bem próximos.

<sup>A</sup>Avaliação de um intermediário reativo, o nitrito, uma estimativa da produção de oxido.

<sup>C</sup>Composto puro (não na associação).

**Observação:** Notar que alguns indutores de EROs/ERNs na célula fúngica são, na verdade, antioxidantes, sendo que o paradoxo efeito pró-oxidante destes compostos podem estar associados a uma possível pleiotropia (mecanismos de ação paralelos que gerem oxidantes) ou metabolismo/sistemas de regeneração (balanço entre as formas oxidadas e reduzidas, *status redox* do sistema biológico) ou uso de altas concentrações (revisado em [25, 55]).

As estruturas químicas representadas foram retiradas do CAS, ou dos artigos aqui referenciados (entre parêntesis) ou desenhadas com auxílio do ACD/Labs (*Advanced Chemistry Development Inc., version 6.0*).

proteção contra o aumento de EROs. Outras bioatividades, para o honokiol, têm sido descritas em concentrações de até 10  $\mu\text{M}$  [77].

Sharma *et al.* [9] demonstraram que curcumina (37-370 mg/L), um polifenol presente em uma variedade de vegetais, apresenta significativa atividade antifúngica (CIMs variando na faixa testada de acordo com o microrganismo) contra espécies do gênero *Candida* (incluindo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. utilis* e uma variedade de isolados resistentes a alguns antifúngicos e mutantes), cujo o mecanismo de ação dependente de EROs conduz a apoptose. Elevação na expressão dos sistemas de defesa antioxidante foram observados (*CAP1-1*, *CaIPF7817*, *SOD2*, *GRP2* e *CAT1*), embora não efetivos. Os autores concluíram que a curcumina pode gerar EO e causar apoptose na célula fúngica, além de inibir o desenvolvimento de hifas por paralelamente e, independente dos níveis de EROs, atuar sobre TUP1. Cabe ressaltar que, como um antioxidante, o efeito esperado para ação da curcumina seria o oposto, ou seja, a prevenção no aumento de EROs. Contudo, as altas concentrações usadas (efeito dependente da concentração) ou os mecanismos redox e de regeneração (ciclo catalítico) durante a atividade do composto em um contexto biológico, podem gerar um quadro pró-oxidativo, como já discutido anteriormente [55].

Como aqui já discutido, o  $\text{HO}^\bullet$  pode ser formado em fungos via reação de Fenton. Recentemente, Avci *et al.* demonstraram que o tratamento de *C. albicans* com 90 mM de ascorbato pode diminuir a viabilidade celular, através de um efeito pró-oxidante originário exclusivamente na reação de Fenton (promovendo a regeneração do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , gerando o radical ascorbato, e prorrogando o ciclo, favorecendo a formação de  $\text{HO}^\bullet$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Este efeito é dependente da temperatura, oxigenação, disponibilidade de fontes de energia e condições do meio e fase de crescimento do fungo [25]. O aumento intracelular de  $\text{HO}^\bullet$  causado pelo ascorbato foi correlacionado a atividade fungicida e, não houve influência de um inibidor mitocondrial, a antimicina A (10  $\mu\text{M}$ ), mas sim pelo tratamento com 500  $\mu\text{M}$  de BIP, demonstrando que, neste caso específico, o EO via mitocôndria foi considerado irrelevante para tal atividade. Quanto a este efeito, os autores comentam que, embora a vitamina C seja um antioxidante existe evidências de um provável efeito pró-oxidante nas concentrações farmacológicas (como a usada, 90 mM), fruto da formação de  $\text{HO}^\bullet$ , efeito este referido como de “rebote”, sendo amplamente relatado para as altas doses. Além disso, atuando sobre tal via, o ascorbato pode regenerar o ferro e intensificar a formação de outras EROs (mecanismos de reciclagens que favorecem um efeito pró-oxidativo).

Por outro lado, Goswami *et al.* [60] demonstraram que 10 mM de ácido ascórbico apresenta efeito antioxidante protegendo *Escherichia coli* da ação de oxidantes (EROs totais) induzidos pelo ciprofloxacino, um antibiótico conhecido por gerar quadro de EO no microrganismo como parte de sua letalidade. Além disso, Khalil *et al.* [78] reportaram que em concentrações de no máximo 250 µg/ml, o ácido ascórbico não apresenta atividade antifúngica frente *C. albicans*, mas pode incrementar as atividades antifúngica e antioxidante da curcumina.

Liao *et al.* [79] mostraram que o shikonina (SK), um composto natural que pode ser isolado de *Lithospermum erythrorhizon*, promove intensa formação endógena de •NO em *C. albicans*, de maneira dependente do tempo e concentração, e isto é associado ao efeito antifúngico. A adição de doadores de •NO, como a S-nitrosoglutationa (GSNO) ou L-arginina, pode incrementar a atividade do SK contra *C. albicans*, enquanto, a adição de um inibidor da produção de •NO, o L-NAME, atenuou a ação antifúngica. Como esperado, uma hiperexpressão do gene *YHB1* foi evidenciado em células fúngicas tratadas com SK. Complementando este achado, o mutante nulo *YHB1* (*yhb1Δ/Δ*) exibiu alta sensibilidade ao SK. Os autores sugerem que a ação de SK *in vivo* poderia impulsionar também a ação de fagócitos frente ao fungo, desde que tais células usam a produção de •NO para combater patógenos. Ainda, a utilização de compostos que possam induzir •NO em focos infecciosos demonstra ser uma estratégia promissora na terapêutica, desde que este composto apresenta atividade antimicrobiana também contra o *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. [79].

Outros compostos naturais são destacados na tabela 4, como o ácido retigérico B [72] e perilenequinonas [74], que também conduzem ao acúmulo de EROs associado ao efeito fungicida. O (+)-medioresinol [38], o *styraxjaponoside* C [43], a amentoflavona [42], o *plagiochin* E [40, 41], e a purpurina [31] (com destaque para a sua ação anti-biofilme) elevam as concentrações de EROs e sinalizam para apoptose, culminando na atividade antifúngica com marcantes CIMs, sendo que pode ocorrer disfunção mitocondrial em alguns casos.

Com relação à associação sinérgica entre produto natural e antifúngico tradicional, estudos têm demonstrado que a curcumina (composto já discutido aqui [80]), alicina [81] e a baicaleína [39] frente à *C. albicans*, e alguns dihidroxibenzaldeídos (2, 3 DHBA e 2, 5 DHBA) contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. [82], podem incrementar o efeito fungicida da AnB via um acúmulo de EROs na célula fúngica. Como aqui já discutido, alguns flavonoides podem incrementar a ação antifúngica do FLC dependente de EROs.

### **Imunomodulação como uma possível ação potencializadora do efeito antifúngico *in vivo***

A esta altura, cabe aqui fazer uma clara distinção entre a indução por alguns compostos, da produção exacerbada de EROs/ERNs diretamente na célula fúngica, de uma possível modulação de fagócitos ou outras células, *in vitro* ou *in vivo*, para gerar EROs/ERNs e, conseqüentemente, facilitar a ação fungicida. Neutrófilos, monócitos/macrófagos (MΦ) e outras células fagocíticas geram EROs/ERNs que, em altas concentrações, podem ser tóxicas para maioria dos patógenos fúngicos, causando danos às proteínas, DNA e lipídeos, sendo o complexo enzimático NADPH oxidase (isoforma Nox2) responsável pela produção inicial de  $O_2^{\bullet}$  a partir do  $O_2$  [19, 21, 83].

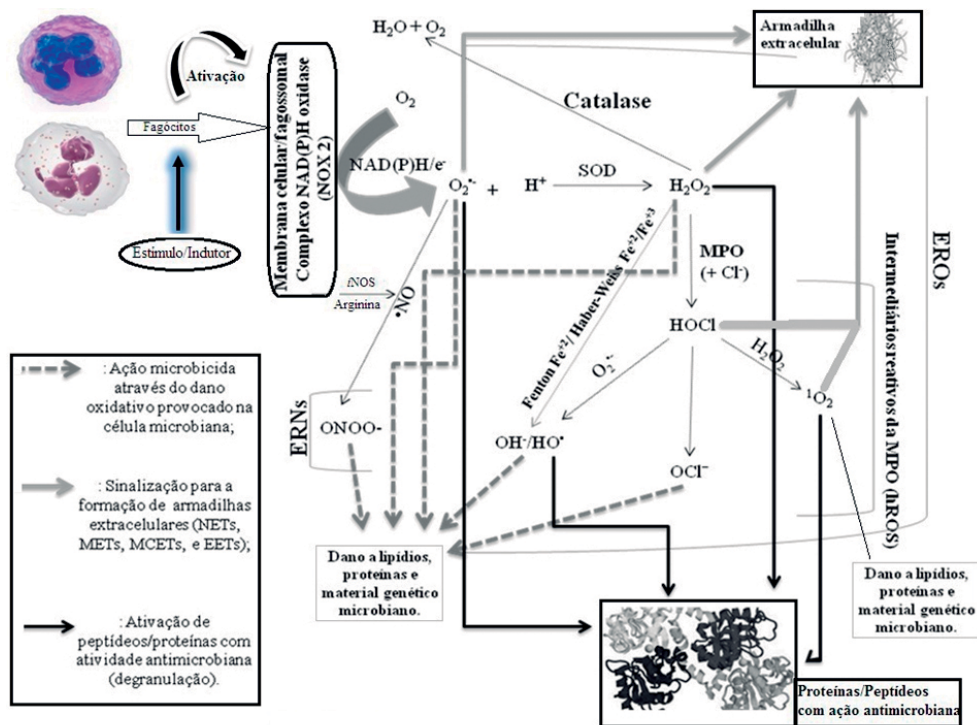
Diferentes células, incluindo as provenientes de humanos, plantas e fungos, podem aumentar a produção de EROs/ERNs, sob certas circunstâncias, mas o termo *burst* oxidativo (explosão respiratória) é mais bem definido e aplicável ao aumento repentino do consumo de  $O_2$  principalmente por fagócitos (principalmente os neutrófilos, com aumento de até 20 vezes na captação de  $O_2$ ) que não é refletido em produção energética, mas sim na rápida e alta produção de  $O_2^{\bullet}$  pelo sistema Nox 2, quando este complexo enzimático é acionado por estímulos adequados (como os microbianos, químicos ou físicos) e na sequência montado para produzir tal oxidante (figura 7) [84, 85]. Até aqui, nós destacamos que a produção excessiva de EROs/ERNs por indutores, não se relaciona, exceto quando notado, ao *burst* oxidativo, mas sim a específicos contextos que também dependem do balanço entre os oxidantes induzidos e os sistemas de defesa antioxidante na célula fúngica.

Ainda em fagócitos, a partir do  $O_2^{\bullet}$ , são formados intermediários mais reativos, tais como o  $H_2O_2$  e, através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO), o  $HO^{\bullet}$ , o ácido hipocloroso (HOCl, gera o ânion hipoclorito [ $OCl^-$ ]) e o oxigênio molecular singleto ( $^1\Delta_g O_2$ ), que, são altamente reativos e potentes antimicrobianos. Ainda, com ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (*i*NOS) que utiliza a arginina como substrato (e NADPH e  $O_2$ ), o  $\bullet NO$  formado reage rapidamente com  $O_2^{\bullet}$ , originando o ONOO $^-$ , um potente antimicrobiano [86, 87]. A importância do complexo NADPH oxidase e formação de EROs/ERNs na defesa contra fungos é notória, visto que, em pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), uma condição genética que conduz a perda de funcionalidade deste complexo, as infecções por fungos oportunistas são recorrentes e as taxas de mortalidade elevadas [87].

Dante disto, é notório que compostos/outros agentes que possam induzir EROs/ERNs em fagócitos, para uma ação antifúngica, sob certas circunstâncias, também são desejáveis, como visto em prévios estudos. Assim, os agentes indutores de EO devem



ser planejados considerando-se também as ações *in vivo*, com possível acionamento da produção de oxidantes em outras células/alvos, podendo até mesmo, sob algumas circunstâncias, ser considerado um co-efeito desejável para a ação antifúngica.



**Figura 7.** Efeitos da ativação do sistema Nox2 de fagócitos por indutores/estímulos.

**Legenda:** Após ser ativado por um estímulo/indutor apropriado, o sistema Nox2 do fagócito, seja na membrana plasmática (forma oxidantes extracelulares) ou fagossomal (forma oxidantes intracelulares), é montado e gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a partir  $\text{O}_2$ . Em seguida, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode por ação enzimática (via SOD) ou espontaneamente gerar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reações subsequentes envolvendo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduzem a formação de outras EROs mais potentes ( $\text{HO}^{\bullet}$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ) seja pela ação da MPO ou na reação de Fenton. Ainda, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode interagir com o  $\bullet\text{NO}$  para gerar  $\text{ONOO}^{\bullet}$ . Como mostrado na figura, alguns destes oxidantes, formados pelos fagócitos, podem causar danos diretos ao microrganismo (normalmente os mais potentes:  $\text{ONOO}^{\bullet}$ ,  $\text{HO}^{\bullet}$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ), acionar proteínas ou peptídeos com ação antimicrobiana (como exemplo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que modula alostericamente proteínas ou  $\text{O}_2^{\bullet-}$  que promove uma ativação redox de proteínas), ou sinalizar ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ) para o desprendimento de armadilhas extracelulares que podem capturar e matar o microrganismo (estruturas compostas por cromatina condensada e grânulos proteicos com ação antimicrobiana, que são nomeadas de acordo com o fagócito que as formam: armadilhas extracelulares de neutrófilos [NETs], de monócitos/macrófagos [METs], de eosinófilos [EETs] ou de mastócitos [MCETs]).

Como exemplos, não apenas restrito a agentes químicos, além da conhecida direta ação antifúngica da inativação fotodinâmica contra células planctônicas e biofilmes fúngicos gerando EO/EM [26, 88-91], para uma imunomodulação, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que, sob influência do LASER de baixa potência (laserterapia [LT], comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 660 e 780 nm), neutrófilos aumentam o *burst* oxidativo contra *C. albicans* ou *P. brasiliensis*, conseqüentemente, aumentando a atividade fungicida, sendo a LT considerada uma viável alternativa terapêutica contra as infecções fúngicas superficiais [92]. De relevância clínica, a LT também poderia ser utilizada *in vivo* para a eliminação de biofilmes fúngicos superficiais e, principalmente, em superfícies de dispositivos médicos, tais como cateteres, desde que esta alternativa também é capaz de induzir o aumento de EROs diretamente em fungos.

Quanto aos clássicos agentes antifúngicos, Roilides *et al.* demonstraram que a AnB pode induzir o *burst* oxidativo de neutrófilos, aumentando ainda mais a sua efetividade fungicida *in vivo* contra conídios de *A. fumigatus* [93]. Também, Tohyama *et al.* demonstraram que M $\Phi$  murinos podem aumentar a produção de  $\bullet$ NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 sob influência da AnB, dessa forma, incrementando a ação anti-*Cryptococcus* spp. [94]. A combinação de AnB e IFN- $\gamma$  conduz a uma marcante ação anti-*Candida* spp. de M $\Phi$ , mas que pode ser independente de EROs/ERNs, indicando que este agente antifúngico pode também agir através de diferentes vias como um imunomodulador [95]. Estes achados são confirmados pelos estudos de Chapman e Hibbs [96]; Wilson *et al.* [97], que mostraram que a AnB pode se ligar a membrana de fagócitos e provocar mudanças conformacionais do complexo NADPH oxidase e, conseqüente acionamento, por exemplo, reforçando o *burst* oxidativo induzido por PMA, um clássico agente químico ativador deste evento.

Interessantemente, Arana *et al.* [59] encontraram que concentrações subliminares do FLC pode elevar a defesa antioxidante de *C. albicans* (incremento na expressão gênica de *TRR1*, *GRE2* e *YHB1* como uma resposta adaptativa) e, conseqüentemente, favorecer a sobrevivência do fungo (proteção *in vitro*), tendo uma repercussão funcional na interação deste microrganismo frente a fagócitos do hospedeiro humano (provável proteção *in vivo*), no que diz respeito à detoxificação de oxidantes gerados durante o *burst* oxidativo e conseqüente proteção quanto à ação antifúngica destas células. Esta prévia sensibilização, pode gerar um *priming* de mecanismos de defesa antioxidante no fungo.

Contudo, conforme um estudo conduzido por Kos *et al.* [98], *in vivo*, provavelmente, o estresse catiônico promovido por fagócitos pode atuar sinergicamente com o *burst* oxidativo para promover o *killing* de *C. albicans*, como confirmado por análises do perfil de resposta antioxidante deste fungo. Estas análises mostraram que a expressão e acú-

mulo do gene *CAP1* pode ser alterada sob tais condições, portanto, não protegendo o fungo da ação microbicida de EROs. O autor comenta que este mecanismo microbicida combinatório de fagócitos (EO somado ao estresse catiônico), pode ser um efetivo mecanismo de contra-ataque dos fagócitos aos achados de Arana *et al.* [59], que demonstraram a chamada “proteção cruzada contra o EO”, onde uma prévia exposição ao EO (exposição subinibitória) leva a proteção do fungo. Além disso, também evidenciado as diferenças entre *in vitro* e *in vivo*, Hazen *et al.* [99] já haviam relatado que concentrações subinibitórias do FLC, administradas em um longo prazo, podem contribuir com a resistência a candidemia, em que foi avaliada a fagocitose e atividade fungicida (*in vitro*) de neutrófilos isolados de pacientes imunocompetentes e previamente tratados com FLC. Estas divergências entre estudos, quanto ao desfecho clínico, talvez, em parte, possam explicar a controvérsia quanto ao uso profilático de baixas doses do FLC.

### **Resistência frente aos antifúngicos e aumentos em virulência e patogenicidade relacionadas a uma prévia resistência ao estresse oxidativo**

Mundialmente, a resistência aos antifúngicos, somado a um inadequado diagnóstico do agente causal de infecções, são os maiores problemas no tratamento de IFIs, sendo as taxas de mortalidade nestes casos reportadas entre 20 e 90% para patógenos fúngicos oportunistas, incluindo *C. albicans*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* [31, 100]. Resistência aos azóis (principalmente FLC) tem sido relatado em cepas de fungos expressando consideráveis concentrações de oxidoredutases, como visto em perfis genômicos, transcriptômicos e metabolômicos (bioquímicos/funcionais), principalmente associados aos genes *GPX1* e *CDR*. Isto reforça que, como parte de seu mecanismo de ação, esta classe de antifúngicos conduz a formação de EROs/ERNs e consequente efeito fungicida. Além disso, cepas resistentes aos antifúngicos expressando altas taxas dos genes *IPF10565*, *ALD5*, *SOD* e *CAT* tem sido reportada [59, 61]. Como já discutido nesta revisão, Paul *et al.* mostraram que resistência em *C. neoformans* ao FLC é correlacionada a hiperexpressão do gene *YAPI* e consequente resistência ao EO promovido por este antifúngico [27].

Como visto aqui, exposição de *C. albicans* a concentrações sub-inibitórias de FLC pode proteger este microrganismo de uma subsequente ação de fagócitos. Este fato relaciona-se ao fato que, FLC a baixas concentrações, induz quadro de EO mais brando na célula fúngica, com posterior sobrevida e montagem adequada de uma resposta antioxidante, primando o fungo e o favorecendo frente à ação de oxidantes gerados pelos fagócitos.

Diante deste contexto, é plausível que cepas de fungos que expressem naturalmente altas concentrações de enzimas com atividade antioxidante possam favorecer o microrganismo

em ambos os contextos, frente à ação de antifúngicos que possam induzir EROs ou ERNs ou frente à resposta microbicida de fagócitos, tendo um notório impacto na virulência e patogenicidade da cepa em questão. Além disso, Navarathna *et al.* demonstraram que concentrações subinibitórias de FLC aumentam a patogenicidade de *C. albicans* em um modelo animal de candidíase disseminada, também evidenciando que os efeitos do FLC são estritamente dependentes da concentração [101].

Em linha com os achados de Arana *et al.* [59], que demonstram que uma proteção cruzada contra o EO, previamente induzido por concentrações subinibitórias de FLC, desfavorecendo o hospedeiro, Kohanski *et al.* [102] já haviam demonstrado que concentrações sub-letais de alguns antibióticos podem elevar os oxidantes em bactérias e dessa forma induzir mutagênese, tendo como consequência, uma resistência a múltiplos antimicrobianos.

Segundo Brown *et al.* [20], em *C. albicans*, a proteína Cta4p é requerida para resistência a ERN, Hog1p, Ssk1p, Sho1p, Capp e Skn7p a ERO e, Pde2p a ERO/ERN. Em *C. neoformans*, Yap4p é relacionada à resistência ao EN, Hog1p, Ssk1p, Tco2p e Atf1p ao EO e, Pkc1p, a ambos EO/EN. Resistência ao EO em *A. fumigatus* é via aumento de Sho1p, SakAp, Skn7p e Yap1p (contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Alguns mecanismos podem ser considerados paralelos para a defesa do fungo contra EROs/ERNs. Como exemplos, na presença de aumentados níveis de EROs/ERNs, além dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos serem acionados, a autofagia é uma forma do fungo preservar biomoléculas e organelas danificadas pela oxidação, de modo que os lisossomos promovem uma intensa recuperação celular. Aproximadamente 33 genes são relacionados à autofagia (GRAs) em fungos, em resposta ao EO/EN. Este mecanismo de defesa em fungos é semelhante aqueles observados em patologias humanas envolvendo resposta ao EO/EN, como ocorre nas doenças neurodegenerativas [33]. A mitofagia é uma autofagia envolvendo a mitocôndria e tem sido observada em casos de EO com disfunção mitocondrial (em que esta organela é a provável maior fonte de EROs) [33]. Ainda, o fungo pode acionar a via proteolítica do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), visando degradar e remover proteínas oxidadas. Embora este mecanismo seja restrito a proteínas dispersas no citoplasma fúngico, proteínas oxidadas ou desdobradas de origem no RE, podem migrar e sofrer este processo de degradação, inclusive naqueles casos de EO relacionado a esta organela [33].

## Perspectivas

Diante do exposto, é notório que, a indução do EO ou EN, seja diretamente na célula fúngica ou em fagócitos, pode representar um potencial novo alvo terapêutico. Além

disso, este novo mecanismo seria de grande utilidade para conter doenças infecciosas que estão relacionadas à formação de biofilmes, uma vez que a formação de biofilmes por fungos é um sério agravante que dificulta a ação dos antifúngicos, e eleva as taxas de morbimortalidade associadas à doença.

Delattin *et al.* reportaram sobre o mecanismo de ação dos clássicos antifúngicos MN e AnB contra biofilmes por espécies de *Candida* [100]. De nota, a formação de biofilmes por cepas mais virulentas de *C. albicans*, normalmente envolve aumento na capacidade de defesa antioxidante pelo microrganismo. Como revelado por estudos proteômicos conduzidos por Seneviratne *et al.* [102-103] e por Bink *et al.* [104]. Linhares *et al.* [61] encontraram um aumento na defesa antioxidante de *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes a dois antifúngicos, FLC e AnB. Células destas cepas, em biofilme, demonstraram expressar diferencialmente SOD e catalase em resposta ao EO [61].

Existem diversas variáveis a serem consideradas quando o alvo indução de EO ou EN são levados em conta, além do já mencionado elaborado arsenal de defesa antioxidante lançado pelo fungo. Para Brown *et al.* [20], maior resistência ao EO em espécies de *Candida spp.* (principalmente *C. albicans* e *C. glabrata*) é mais comum *in vitro* na fase estacionária, demonstrando que durante o crescimento o fungo apresenta expressão diferencial de proteínas chave na defesa frente ao EO. Assim, a resistência ao EO é associada à diminuição nas taxas de multiplicação das células fúngicas.

Mesmo neste contexto, as perspectivas são enormes para estes mecanismos. Sendo assim, não apenas restrito a atividade sobre células planctônicas, Peralta *et al.* [75] demonstraram que o ácido úsnico (4 µg/mL), um composto natural que foi obtido de *Usnea amblyoclada*, apresenta ação sobre biofilmes maduros de *C. albicans* resistente aos azóis, diminuindo em até 71% a massa e espessura desta estrutura. Os autores reportaram que este efeito foi relacionado a um prévio EO e EN induzidos pelo ácido úsnico, apresentou aumento de EROs/ERNs até 30 vezes maior que os controles. A respeito do aumento de EROs/ERNs, os autores demonstram que EROs são formados tanto no ambiente extracelular do biofilme (avaliados no sobrenadante com o teste do NBT), quanto intracelularmente em *C. albicans* (avaliados por uma sonda que permeia a membrana e detecta todos os tipos de oxidantes, a DCFH-DA), cogitando que os danos associados aos EO e EN podem comprometer a integridade celular, bem como promover danos a componentes extracelulares essenciais ao biofilme, como os polissacarídeos.

Além disso, Peralta *et al.* [75] demonstraram que os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (como exemplo, Sodp) e não enzimáticos de *C. albicans* estavam aumentados em resposta ao tratamento com ácido úsnico, confirmando que houve aumento

de EROs/ERNs. Os autores propõem o ácido úsnico como uma alternativa para o tratamento de infecções as quais ocorrem à formação de biofilmes de *C. albicans*.

Através de estudos transcriptômicos, Cremer *et al.* [105] mostraram os perfis de vários genes relacionados a sistemas antioxidantes em *C. albicans* que são alterados a longo prazo (até 24h) durante a atividade antibiofilme do MN, posteriormente, confirmando que houve um marcante e essencial aumento de  $O_2^{\bullet-}$  correlacionado com a atividade (demonstrado com o uso de compostos sinérgicos para induzir  $O_2^{\bullet-}$ , usando também um mutante triplo para Sodp, ou o inibidor desta enzima, o N-N'-dietilditiocarbamato). Elevados níveis de expressão de genes para mediadores de rotas da biossíntese do ergosterol (*ERG6*, *ERG251*, *ERG3* e *ERG2*) e bombas de efluxo (*CDR2* e *orf19.4531*) foram verificados (expressões gênicas reguladas desde um curto prazo de exposição ao MN, ou seja, a partir de 4 horas). Interessantemente, contrastando com outros achados, após 4 ou 24 horas, a maioria dos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de *C. albicans* não foram induzidos significativamente (repressão de *CAT1*), o que pode ser explicado por um efeito pleiotrópico deste antifúngico em elevar os níveis de EROs e regular a expressão gênica, culminando em níveis elevados dos oxidantes e reforçando o efeito fungicida (o sistema de defesa antioxidante do fungo também seria um alvo). De nota, apenas *SOD5* foi induzido em *C. albicans*, após 24 horas de exposição ao MN, provavelmente, para conter o marcante acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ .

Como mostrado nesta revisão, o campo de estudo englobando a indução de EO ou EN como um novo alvo na busca por novos antifúngicos tem sido explorado, não apenas restrito a busca de novos compostos de variadas fontes naturais ou sintéticos (estes últimos, fugindo do escopo desta revisão, mas destacado na literatura), mas também tentando elucidar o mecanismo de ação de tradicionais antifúngicos [100, 106, 107]. Desde que a resistência ao EO/EN em fungos também pode ocorrer (vias sistemas de defesa antioxidante), elucidar os mecanismos subjacentes torna-se também essencial. Das aproximadamente 400 espécies fúngicas patogênicas para humanos [20], as dos gêneros *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.* foram as mais reportadas nesta revisão.

Como limitações dos estudos avaliados, grande parte destes não avaliaram as específicas fontes de EROs/ERNs dentro da célula fúngica (com exceções) bem como os específicos oxidantes produzidos, discriminando se, estes oxidantes, são gerados pela ação direta dos indutores em tradicionais vias (fontes) endógenas de EROs ou ERNs estão criando fontes, como parte do mecanismo de ação ou metabolismo do composto pelo fungo. Além disso, nós entendemos as limitações metodológicas que permeiam a identificação de oxidantes relacionados aos EO e EN, bem como a ava-

liação de eventos relacionados, como os danos a biomoléculas e o desfecho associado, a ação antifúngica.

Cabe ressaltar que, muitas substâncias naturais reportadas aqui apresenta, normalmente, atividade antioxidante e, o paradoxal efeito pró-oxidante promovido por estes compostos, são frutos de seus ciclos redox ou concentrações no ambiente biológico/celular fúngico, fugindo de o escopo desta revisão acentuar os mecanismos mais detalhados deste efeito pró-oxidante, mas que podem ser revistos em prévios estudos [25, 55, 108]. Existem inúmeras barreiras a serem transpostas entre os estudos *in vitro* e em determinados modelos experimentais *in vivo* e a implementação destes “antioxidantes” na terapêutica de infecções fúngicas em humanos, para que o mecanismo antifúngico em doses compatíveis com os estudos preliminares seja alcançado sem danos ao hospedeiro. Notoriamente, embora seja destacado o efeito pró-oxidante destes compostos para induzir EO/EN na célula fúngica, com concentrações/doses e mecanismos específicos, em humanos, estes compostos poderiam exercer efeito dual de acordo com a especificidade da célula alvo, desde que o ciclo redox destes antioxidantes sofra grandes influências do contexto de cada meio, em que diferentes tipos celulares reagiriam com um dos dois possíveis desfechos: efeito pró-oxidante ou antioxidante. Ainda, um efeito destes antioxidantes a altas concentrações, por si só, poderia levar a um quadro de estresse redutivo, ou induzir uma resposta antioxidante exacerbada do hospedeiro, via o fator de transcrição Nrf2, como tem sido descrito em pacientes com predisposição genética ou sob certas condições [108-111].

Também, a aplicabilidade clínica de certos compostos depende de complexos fatores *in vivo*, como os fatores farmacocinéticos, e de outros fatores que envolvem co-resposta dos fungos aos outros tipos de estresses *in vivo* (perfil funcional de resistência cruzada), como as alterações de pH, temperatura, osmolaridade, pressão e, principalmente, disponibilidade de fontes de O<sub>2</sub> e de nitrogênio. Estudos destes compostos em modelos experimentais mais fidedignos, *in vivo*, podem lançar luz sobre a possível ação antifúngica envolvendo um EO ou EN neste contexto, desde que não haja extensão dos danos ao hospedeiro. Além disso, os desafios que normalmente são encontrados para a implementação na terapêutica de um novo composto de fonte natural devem ser superados [112].

A literatura é divergente sobre os efeitos de EROs/ERNs e os EO/EN associados serem microbiostáticos ou microbicidas [113]. Independente do efeito, a participação de oxidantes no mecanismo de ação de determinado antifúngico não é descartada, e efeito clínico associado, fungistático ou fungicida, parece ser mais bem entendido tendo como base os dados apresentados na figura 4. Desde que um EO/EN com sutis aumentos de EROs/ERNs induzem uma morte celular mais branda (como exemplo, a apoptose),

o efeito *in vivo*, em curtos intervalos de administração do antifúngico, mais provavelmente seria fungistático. Por outro lado, na indução de um EO/EN mais intenso, com elevados níveis de oxidantes, o desfecho clínico mais provável seria uma ação fungicida, mesmo nas primeiras horas de administração do agente terapêutico.

Por fim, para aqueles antimicrobianos que utilizam a produção de EROs/ERNs durante seu mecanismo de ação, destaca-se que doses subinibitórias (sub-letais) de antimicrobianos podem elevar, paralelamente a outros efeitos, a resposta antioxidante do microrganismo previamente exposto. Isto poderia diminuir ou tornar ineficaz a atividade antimicrobiana em uma utilização futura do antimicrobiano (mesmo que em doses recomendadas), uma vez que o prévio *priming* (causado pela dose sub-letal) elevaria a resposta antioxidante do microrganismo para a detoxificação das ERO/ERN [114-119].

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após estabelecer um claro conceito de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como examinar as metodologias quanto à adequação para avaliar tal evento bioquímico, foi demonstrado nesta revisão sistemática que um considerável número de publicações aborda os temas “indução de EO ou EN como parte do mecanismo antifúngico”. Os argumentos para comprovar a participação de EROs ou ERNs na atividade antifúngica incluem: quantificação destes oxidantes, análises de sistemas de defesa antioxidante do fungo, aferições dos danos a biomoléculas causadas por EROs/ERNs, além do uso de antioxidantes exógenos atuando como *scavengers* de oxidantes para impedir o EO/EN e danos oxidativos associados.

A questão se EROs/ERNs geram efeito fungicida preferencialmente que o fungistático ainda está aberta, em um contexto em que estes oxidantes também podem paralelamente sinalizar eventos apoptóticos por diferentes vias (dependentes ou não de caspases). A sinalização de apoptose pode estar também relacionada à específica fonte de EROs estimulada pelo indutor, que determinara o acionamento de vias paralelas devido a um ou mais oxidantes específicos serem produzidos e, em concentrações apropriadas (como exemplo, o  $H_2O_2$  é um bom indutor de apoptose). O *link* entre indução de EROs mitocondrial e o controle do balanço redox para a produção de  $H_2O_2$  parece ser fundamental para a ativação do apoptose via mitocondrial (interação citocromo *c* e metacaspase).

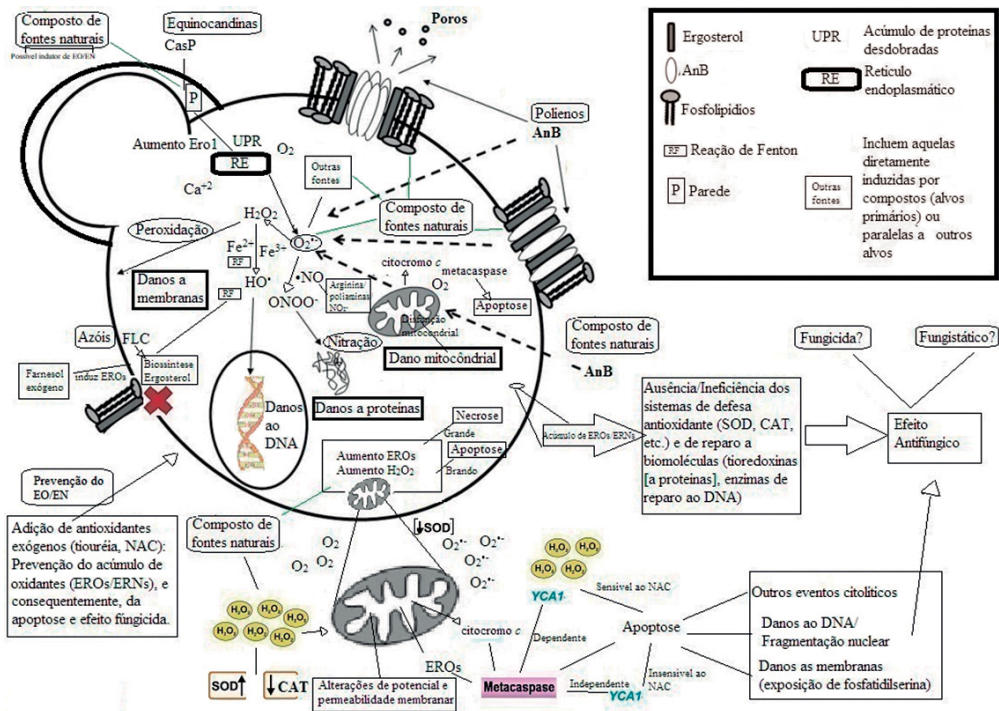


Um claro *link* entre estresse oxidativo ou nitrosativo e a atividade antifúngica (com marcantes e promissoras CIMs ou CFMs) tem sido firmado na literatura recente, tanto para aqueles agentes antifúngicos já utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas em humanos, quanto para possíveis candidatas a fármaco (resumido na figura 8). Portanto, a indução do EO ou EN como parte do mecanismo de ação demonstra ser importante alvo terapêutico, com perspectivas favoráveis sobre os desfechos na prática clínica. Contudo novos estudos (incluindo os metabolômicos) devem ser conduzidos para um melhor entendimento a nível molecular do efeito global deste evento na célula fúngica, bem como as possíveis repercussões para o hospedeiro.

Muitas publicações (22 artigos) encontradas nesta revisão destacaram o *link* entre o aumento de EROs/ERNs associado ao efeito de clássicos antifúngicos, o que demonstra uma preocupação em elucidar o completo mecanismo de ação destes agentes terapêuticos, na tentativa de também entender melhor como a resistência a estes antifúngicos são alcançadas por parte dos fungos. Assim, a possível associação sinérgica entre compostos de origem natural e clássicos antifúngicos tem sido avaliada.

Quanto aos compostos de fontes naturais induzindo EROs/ERNs como parte de seus mecanismos antifúngicos (32 artigos encontrados) contra células planctônicas ou biofilmes, aqueles provenientes de plantas foram os mais frequentes. Normalmente, a maiorias deles são antioxidantes (principalmente os flavonoides), mas por conta das concentrações utilizadas ou o ciclo redox dentro da célula fúngica, estes compostos demonstraram exercer também, um efeito majoritariamente pró-oxidante, elevando as concentrações de EROs ou ERNs e causando o efeito antifúngico. Ainda, muitos indutores de EO é da classe dos lignanos (incluindo neolignanos) e correlatos (os fenilpropanóides), demonstrando um papel importante desta classe na sinalização de um acúmulo de EROs em fungos.

Novos estudos na busca de agentes antifúngicos explorando o *status* redox devem também focar sobre a especificidade da indução de um EO ou EN contra o fungo e os possíveis efeitos tóxicos para humanos, advindos deste evento bioquímico. Neste contexto, a busca por compostos provenientes de fontes naturais parece plausível, visto que metabólitos secundários são naturais mecanismos de defesa, apresentando, normalmente, uma ação antifúngica, que pode ser via aumento de EROs/ERNs, mas sem causar danos ao hospedeiro e, entender os mecanismos dos EO e EN em fungos pode também ser útil para a formulação de novas combinações terapêuticas entre produtos naturais e antifúngicos clássicos, atuando de maneira sinérgica.



**Figura 8.** Representação esquemática das possíveis rotas de formação das EROs/ERNs na célula fúngica induzidas por clássicos agentes antifúngicos ou novos compostos.

**Legenda:** Após as EROs/ERNs serem formadas, os sistemas de defesa antioxidante serão acionados. Uma ausência ou ineficiência desta defesa promoverá o quadro de EO ou EN, que pode acionar diferentes rotas de ativação de apoptose ou levar a danos oxidativos a biomoléculas, incluindo os danos oxidativos do DNA (especialmente por HO<sup>•</sup>), nitração proteica (por ONOO<sup>-</sup>) e a peroxidação lipídica (induzida principalmente pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As interações entre os oxidantes com geração de produtos, podem não aparecer balanceadas nesta figura.

## AGRADECIMENTOS

CDC gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## CONFLITO DE INTERESSES

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

## REFERÊNCIAS

1. R. Santamaría, L. Rizzetto, M. Bromley, *et al.*, Systems biology of infectious diseases: a focus on fungal infections, *Immunobiology*, **216**, 1212 (2011).
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Antibiotic Resistant Threats in the United States*, 2013, p. 114 p., 2013.
3. P. Vandeputte, S. Ferrari, A.T. Coste, Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections, *Int. J. Microbiol.*, **2012**, 26 (2012).
4. G.F. Ferreira, L.M. Baltazar, J.R.A. Santos, *et al.*, The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 1801 (2013).
5. A. Khan, A. Ahmad, F. Akhtar, *et al.*, Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids, *FEMS Yeast Res.*, **11**, 114 (2011).
6. C.D. Mahl, C.S. Behling, F.S. Hackenhaar, *et al.*, Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **82**, 203 (2015).
7. H. Tian, S. Qu, Y. Wang, *et al.*, Calcium and oxidative stress mediate perillaldehyde-induced apoptosis in *Candida albicans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 3335 (2017).
8. Z. Wang, Y. Shen, Antifungal compound honokiol triggers oxidative stress responsive signalling pathway and modulates central carbon metabolism, *Mycology*, **7**, 124 (2016).
9. M. Sharma, R. Manoharlal, N. Puri, *et al.*, Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*, *Biosci. Rep.*, **30**, 391 (2010).

10. D. Kobayashi, K. Kondo, N. Uehara, *et al.*, Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3113 (2002).
11. A.C. Mesa-Arango, L. Scorzoni, O. Zaragoza, It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug, *Front. Microbiol.*, **3**, 1 (2012).
12. J.P. Guirao-Abad, R. Sánchez-Fresneda, B. Albuquerque, *et al.*, ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*, *Int. J. Med. Microbiol.*, **307**, 241 (2017).
13. A.J. Philips, I. Sudbery, M. Ramsdale, Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327 (2003).
14. M.P. Brynildsen, J.A. Winkler, C.S. Spina, *et al.*, Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production, *Nature Biotechnol.*, **31**, 160 (2013).
15. I. Albesa, M.C. Becerra, P.C. Battan, *et al.*, Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 605 (2004).
16. I. Keren, Y. Wu, J. Inocencio, *et al.*, Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species, *Science*, **339**, 1213 (2013).
17. Y. Liu, J.A. Imlay, Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species, *Science*, **339**, 1210 (2013).
18. D.J. Dwyer, P.A. Belenky, J.H. Yang, *et al.*, Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E2100 (2014).
19. P. Belenky, D. Camacho, J. J. Collins, Fungicidal drugs induce a common oxidative damage cellular death pathway, *Cell Reports*, **3**, 350 (2013).
20. A.J.P. Brown, K. Haynes, J. Quinn, Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity, *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**, 384 (2009).
21. H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.*, **4**, 180 (2015).

22. B.S. Hromatka, S.M. Noble, A.D. Johnson, Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4814 (2005).
23. D. Cánovas, J.F. Marcos, J. Strauss. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel?, *Curr. Genet.*, **62**, 513 (2016).
24. Q. Yu, B. Zhang, J. Li, *et al.*, Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*, *Free Rad. Biol. Med.*, **99**, 572 (2016).
25. P. Avci, F. Freire, A. Banvolgyi, *et al.*, Sodium ascorbate kills *Candida albicans in vitro* via iron-catalyzed Fenton reaction: importance of oxygenation and metabolism, *Future Microbiol.*, **11**, 1535 (2016).
26. J. H. Lee, I. Y. Choi, I. S. Kil, *et al.*, Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 191 (2001).
27. S. Paul, T.L. Doering, W.S. Moye-Rowley, *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance, *Fungal Genet. Biol.*, **74**, 1 (2015).
28. T. Rossignol, B. Kocsis, O. Bouquet, *et al.*, Antifungal activity of fused Mannich ketones triggers an oxidative stress response and is Cap1-dependent in *Candida albicans*, *PLoS ONE*, **8**, e62142 (2013).
29. G. Bartosz, Reactive oxygen species: destroyers or messengers?, *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1303 (2009).
30. M. Ramsdale. Programmed cell death in pathogenic fungi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1369 (2008).
31. P.W-K. Tsang, A.P-K. Wong, H-P. Yang, *et al.*, Purpurin triggers caspase-independent apoptosis in *Candida dubliniensis* biofilms, *PLoS ONE*, **8**, e86032 (2013).
32. A. Hamann, D. Brust, H.D. Osiewacz, Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing, *Trends Microbiol.*, **6**, 276 (2008).
33. G. Farrugia, R. Balzan, Oxidative stress and programmed cell death in yeast, *Frontiers*, **2**, 1 (2012).
34. A. Sharon, A. Finkelstein, N. Shlezinger, *et al.*, Fungal apoptosis: function, genes and gene function, *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 833 (2009).

35. S.A. Mousavi, G.D. Robson, Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype, *Microbiology*, **150**, 1937 (2004).
36. K. Kang, K.S. Wong, W.P. Fong, *et al.*, Metergoline-induced cell death in *Candida krusei*, *Fungal Biol.*, **115**, 302 (2011).
37. J. Cheng, T.S. Park, L.C. Chio, *et al.*, Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 163 (2003).
38. J.H. Hwang, I.S. Hwang, Q.H. Liu, *et al.*, (+)-medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*, *Biochimie*, **94**, 1784 (2012).
39. B.D. Dai, Y.Y. Cao, S. Huang, *et al.*, Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 803 (2009).
40. X.Z. Wu, W.Q. Chang, A.X. Cheng, *et al.*, Plagiochin E, an antifungal active macrocyclic bis(bibenzyl), induced apoptosis in *Candida albicans* through a metacaspase-dependent apoptotic pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 439 (2010).
41. X.Z. Wu, A.X. Cheng, L.M. Sun, *et al.*, Plagiochin E, an antifungal bis(bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 770 (2009).
42. I.S. Hwang, J. Lee, H.G. Jin, *et al.*, Amentoflavone stimulates mitochondrial dysfunction and induces apoptotic cell death in *Candida albicans*, *Mycopathologia*, **173**, 207 (2012).
43. C. Park, E.R. Woo, D.G. Lee, Antifungal effect with apoptotic mechanism(s) of Styraejasponoside C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1255 (2009).
44. A.M. Aerts, D. Carmona-Gutierrez, S. Lefevre, *et al.*, The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*, *FEBS Lett.*, **583**, 2513 (2009).
45. E.O. Mello, S.F. Ribeiro, A.O. Carvalho *et al.*, Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells, *Curr. Microbiol.*, **62**, 1209 (2011).

46. B. Hwang, J.S. Hwang, J. Lee, *et al.*, The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 267 (2011).
47. J. Cho, D.G. Lee. The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 1246 (2011).
48. J. Cho, D.G. Lee. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*, *Biochimie*, **93**, 1873 (2011).
49. B. Hwang, J.S. Hwang, J. Lee, *et al.*, Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 89 (2011).
50. C. Park, D.G. Lee, Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 170 (2010).
51. A. Lupetti, A. Paulusma-Annema, S. Senesi, *et al.*, Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1634 (2002).
52. E.J. Helmerhorst, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14637 (2001).
53. D. Wunder, J. Dong, D. Baev, *et al.*, Human salivary histatin 5 fungicidal action does not induce programmed cell death pathways in *Candida albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 110 (2004).
54. C.R. Silva, J.B.A. Neto, R.S. Campos, *et al.*, Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 1468 (2015).
55. I.D. Podmore, H. R. Griffiths, K.E. Herbert, *et al.*, Vitamin C exhibits pro-oxidant properties, *Nature*, **392**, 559 (1998).
56. P. Liu, L. Luo, J. Guo, *et al.*, Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*, *Mycologia*, **102**, 311 (2010).
57. Q. Gaofua, Z. Fayin, D. Peng, *et al.*, Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway, *Peptides*, **31**, 1978 (2010).

58. I.K. Maurya, S. Pathak, M. Sharma, *et al.*, Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*, *Peptides*, **32**, 1732 (2011).
59. D.M. Arana, C. Nombela, J. Pla, Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes, *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 54 (2010).
60. M. Goswami, S.H. Mangoli, N. Jawali, Antibiotics and antioxidants: Friends or foes during therapy?, *Barc. Newsletter*, **323**, 42 (2011).
61. C.E.B. Linhares, S.R. Giacomelli, D. Altenhofen, *et al.*, Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **46**, 752 (2013).
62. Y. Xu, Y. Wang, L. Yan, *et al.*, Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*, *J. Proteome Res.*, **8**, 5296 (2009).
63. M.L. Sokol-Anderson, J. Brajtburg, G. Medoff, Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*, *J. Infect. Dis.*, **154**, 76 (1986).
64. F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A.C. Mesa-Arango, *et al.*, Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst, *Microbes Infect.*, **13**, 457 (2011).
65. B. Hao, S. Cheng, C.J. Clancy, *et al.*, Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 326 (2013).
66. L. Yan, M. Li, Y. Cao, *et al.*, The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility, *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 764 (2009).
67. K. Thevissen, K.R. Ayscough, A.M. Aerts, *et al.*, Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast, *J. Biol. Chem.*, **282**, 21592 (2007).
68. M.C. Rubio, I.R. de Ocariz, J. Gil, *et al.*, Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 264 (2005).



69. P.G. Sohnle, B.L. Hahn, M.D. Erdmann, Effect of fluconazole on viability of *Candida albicans* over extended periods of time, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2622 (1996).
70. P.G. Sohnle, B.L. Hahn, Effect of prolonged fluconazole treatment on *Candida albicans* in diffusion chambers implanted into mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3175 (2002).
71. A. Zida, S. Bamba, A. Yacouba, *et al.*, Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review, *J. Med. Mycology*, **27**, 1 (2017).
72. W-Q. Chang, X-Z. Wu, A-X. Cheng, *et al.*, Retigeric acid B exerts antifungal effect through enhanced reactive oxygen species and decreased cAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 569 (2011).
73. A. Ostrosky-Zeichner, A. Casadevall, J.N. Galgiani, *et al.*, An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond, *Nature Rev. Drug Discovery*, **9**, 719 (2010).
74. M-Z. Xing, X-Z. Zhang, Z-L. Sun, *et al.*, Perylenequinones act as broad-spectrum fungicides by generation reactive oxygen species both in the dark and in the light, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7722 (2003).
75. M.A. Peralta, M.A. da Silva, M.A. Ortega, *et al.*, Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole-resistant *Candida albicans* Biofilm, *Planta Med.*, **83**, 326 (2017).
76. K-T. Liou, Y-C. Shen, C-F. Chen, *et al.*, Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia–reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production, *Brain Res.*, **992**, 159 (2003).
77. Y. Fukuyama, K. Nakade, Y. Minoshima, *et al.*, Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1163 (2002).
78. O.A.K. Khalil, O.M.M. de Faria Oliveira, J.C.R. Velloso, *et al.*, Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid, *Food Chem.*, **133**, 1001 (2012).
79. Z. Liao, Y. Yan, H. Dong, *et al.*, Endogenous nitric oxide accumulation is involved in the antifungal activity of Shikonin against *Candida albicans*, *Emerg. Microb. Infections*, **5**, e88 (2016).

80. M. Sharma, R. Manoharlal, A.S. Negi, *et al.*, Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 570 (2010).
81. M. An, H. Shen, Y. Cao, *et al.*, Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, 258 (2009).
82. J.H. Kim, N.C. Faria, M.L. Martins, *et al.*, Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes, *Front. Microbiol.*, **3**, 261 (2012).
83. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition, Oxford University Press Inc., New York (NY), 2007.
84. P. Wojtaszek, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem. J.*, **322**, 681 (1997).
85. C. Bogdan, M. Röllinghoff, A. Diefenbach, Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 64 (2000).
86. K-W. Wong, Jr W. R. Jacobs, *Mycobacterium tuberculosis* exploits human interferon  $\gamma$  to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis, *J. Infect. Dis.*, **208**, 109 (2013).
87. M.S. Cohen, R.E. Isturiz, H.L. Malech, *et al.*, Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi, *Am. J. Med.*, **71**, 59 (1981).
88. Y. Sun, S. Yu, P. Sun, *et al.*, Inactivation of *Candida* biofilms by nonthermal plasma and its enhancement for fungistatic effect of antifungal drugs, *PLoS ONE*, **7**, e40629 (2012).
89. K. Fricke, I. Koban, H. Tresp, *et al.*, Atmospheric pressure plasma. a high-performance tool for the efficient removal of biofilms, *PLoS ONE*, **7**, e42539 (2012).
90. M.C. Andrade, A.P. Ribeiro, L.N. Dovigo, *et al.*, Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp., *Arch. Oral Biol.*, **58**, 200 (2013).

91. L.N. Dovigo, A.C. Pavarina, J.C. Carmello, *et al.*, Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin, *Lasers Surg. Med.*, **43**, 927 (2011).
92. C.D. Cerdeira, M.R.P.L. Brigagão, M.L. Carli, *et al.*, Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity, *J. Biophotonics*, **9**, 1180 (2016).
93. E. Roilides, C.A. Lyman, J. Filioti, *et al.*, Amphotericin B formulations exert additive antifungal activity in combination with pulmonary alveolar macrophages and poly-morphonuclear leukocytes against *Aspergillus fumigatus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1974 (2002).
94. M. Tohyama, K. Kawakami, A. Saito, Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1919 (1996).
95. A. Coste, M.D. Linas, S. Cassaing, *et al.*, A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages, *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 731 (2002).
96. H.A. Chapman, Jr., J.B. Hibbs, Jr., Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4349 (1978).
97. E. Wilson, L. Thorson, D.P. Speert, Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 796 (1991).
98. I. Kos, M.J. Patterson, S. Znaidi, *et al.*, Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency, *mBio.*, **7**, e00331-16 (2016).
99. K.C. Hazen, G. Mandell, E. Coleman, *et al.*, Influence of fuconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 89 (2000).
100. N. Delattin, B. Cammue, K. Thevissen, Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms, *Future Med. Chem.*, **6**, 77 (2014).

101. D.H. Navarathna, J.M. Hornby, N. Hoerrmann, *et al.*, Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis, *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 1156 (2005).
102. M.A. Kohanski, M.A. DePristo, J.J. Collins, Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis, *Mol. Cell*, **37**, 311 (2010).
103. C.J. Seneviratne, Y. Wang, L. Jin, *et al.*, *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities, *Proteomics*, **8**, 2936 (2008).
104. A. Bink, G. Govaert, D. Vandenbosch, *et al.*, Transcription factor Efg1 contributes to the tolerance of *Candida albicans* biofilms against antifungal agents *in vitro* and *in vivo*, *J. Med. Microbiol.*, **61**, 813 (2012).
105. K. Cremer, K. Brucker, I. Staes, *et al.*, Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms, *Sci. Reports*, **6**, 27463 (2016).
106. I. E. François, K. Thevissen, K. Pellens, *et al.*, Design and synthesis of a series of piperazine-1-carboxamide derivatives with antifungal activity resulting from accumulation of endogenous reactive oxygen species, *Chem. Med. Chem.*, **4**, 1714 (2009).
107. A. Shirai, S. Ueta, H. Maseda, *et al.*, Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of Gemini-pyridinium salts against yeast, *Biocontrol Sci.*, **17**, 77 (2012).
108. J.D. Lambert, R.J. Elias, The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention, *Arch. Biochem. Biophys.*, **501**, 65 (2010).
109. A.J. León-González, C. Auger, V.B. Schini-Kerth, Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy, *Biochem. Pharmacol.*, **98**, 371 (2015).
110. M. Narasimhan, N.S. Rajasekaran, Reductive potential—A savior turns stressor in protein aggregation cardiomyopathy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 53 (2015).
111. A.C. Brewer, S.B. Mustafi, T.V.A. Murray, *et al.*, Reductive Stress Linked to Small HSPs, G6PD, and Nrf2 Pathways in Heart Disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1114 (2013).

112. T. Roemer, D. Xu, S.B. Singh, *et al.*, Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery, *Chem. Biol.*, **18**, 148 (2011).
113. J.A. Imlay. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think, *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 124 (2015).
114. G.Q. Li, F. Quan, T. Qu, *et al.*, Sublethal vancomycin-induced ROS mediating antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *Biosci. Rep.*, **35**, e00279 (2015).
115. K. Poole, Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, *Trends Microbiol.*, **20**, 227 (2012).
116. Y. Wu, M. Vulic, I. Keren, *et al.*, Role of oxidative stress in persister tolerance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 4922 (2012).
117. M.A. Kohanski, M.A. DePristo, J.J. Collins, Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis, *Mol. Cell*, **37**, 311 (2010).
118. J. Jee, A. Rasouly, I. Shamovsky, *et al.*, Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing, *Nature*, **534**, 693 (2016).
119. W.L. Neeley, J.M. Essigmann, Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 491 (2006).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

C.D. Cerdeira, M. Pereira de Araújo, C.B.R. Jorge-Ferreira, A.L. Tranches-Dias, M.R.P. Lima-Brigagão, explorando os estresses oxidativo e nitrosativo contra fungos: um mecanismo subjacente à ação de tradicionais antifúngicos e um potencial novo alvo terapêutico na busca por indutores oriundos de fontes naturais, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 100-157 (2021).

## Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico

Patrícia de Oliveira Centurião, Patrícia Espinosa dos Santos, Aline Marques Rosa, Nájla Mohamad Kassab\*

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Costa e Silva s/n°, Bairro Universitário, CEP nº 79070-900, Campo Grande – MS, Brasil.

\*Correio eletrônico: nmkassab@gmail.com

Recebido: 21 de fevereiro de 2019

Revisado: 10 de setembro de 2020

Aceto: 14 de outubro de 2020

### RESUMO

**Introdução:** o ácido glicólico é aplicado para o tratamento estético e dermatológico em formulações antirrugas (*anti-aging*), esfoliantes químicos (*peeling*). Considerando a grande utilização em produtos cosméticos, é de suma importância a realização do controle de qualidade dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico, com a finalidade de garantir maior segurança para os usuários. **Objetivo:** avaliar a qualidade de produtos cosméticos de venda livre contendo ácido glicólico disponíveis no comércio nacional. **Materiais e métodos:** foram avaliadas 8 amostras de produtos cosméticos contendo ácido glicólico. Os testes realizados foram: análise do rótulo, características organolépticas dos produtos, determinação do pH, teste de centrifuga e doseamento do ácido glicólico. Quanto ao teor de ácido glicólico as 8 amostras foram aprovadas, pois permaneceram dentro do limite máximo estabelecido pela Anvisa de 10% de ácido glicólico. **Resultados:** no que se refere à avaliação do pH, 4 amostras apresentaram valores abaixo permitido, sendo que o uso de produtos com pH abaixo de 3,5 pode causar irritação e lesão da pele. Já na análise do rótulo as amostras manipuladas faltavam às recomendações e precauções de uso. **Conclusão:** dessa forma, fica evidente a importância do controle de qualidade em produtos contendo ácido glicólico para conferir segurança e eficácia para os usuários.

*Palavra-chave:* Ácido glicólico, produtos cosméticos, controle de qualidade.

## SUMMARY

### Quality assessment of cosmetic products containing glycolic acid

**Introduction:** Glycolic acid is applied for the aesthetic and dermatological treatment in anti-aging formulations, chemical exfoliators (peeling). Considering the great use of glycolic acid in cosmetic products and their applicability, it is become important to carry out the quality control of cosmetic products containing glycolic acid, in order to guarantee its quality as well safety to users. **Aim:** To evaluate the quality of glycolic acid in cosmetic over the counter available in the national market. **Materials and methods:** 8 samples of cosmetic products containing glycolic acid were evaluated. The following tests were performed: label analysis, organoleptic characteristics of the products, pH determination, centrifuge test and glycolic acid assay (volumetric analysis). Regarding the glycolic acid content, the 8 samples were approved, as they remained within the maximum limit established by Anvisa of 10% glycolic acid. **Results:** Regarding the pH evaluation, 4 samples presented values below the allowed, being that the use of products with pH below 3.5 may cause irritation and damage skin. Already in the analysis of the labels from compounding formulation samples, there was no recommendations and precautions of use. **Conclusion:** This way, the importance of quality control in glycolic acid containing products is evident to provide safety and efficacy to users.

*Key words:* Glycolic acid, cosmetics products, quality control.

## RESUMEN

### Evaluación de la calidad de los productos cosméticos que contienen ácido glicólico

**Introducción:** el ácido glicólico se aplica para el tratamiento estético y dermatológico en formulaciones antiarrugas (antienvjecimiento), exfoliantes químicos (*peeling*). Es de suma importancia realizar el control de calidad de los productos cosméticos que contienen ácido glicólico, teniendo en cuenta su amplio uso en productos cosméticos, para garantizar una mayor seguridad para los usuarios. **Objetivo:** evaluar la calidad de los productos cosméticos de venta libre que contienen ácido glicólico disponibles en el mercado nacional. **Materiales y métodos:** se evaluaron 8 muestras de productos cosméticos que contenían ácido glicólico. Las pruebas realizadas fueron: análisis de etiquetas, características organolépticas de los productos, determinación de pH, prueba de centrifugación y ensayo de ácido glicólico. En cuanto al contenido de ácido glicólico, las 8 muestras fueron aprobadas, ya que se mantuvieron dentro

del límite máximo establecido por Anvisa para el ácido glicólico al 10%. **Resultados:** en cuanto a la valoración del pH, 4 muestras arrojaron valores inferiores a los permitidos y el uso de productos con un pH inferior a 3,5 puede provocar irritación y daño cutáneo. En el análisis de la etiqueta, las muestras manipuladas carecieron de las recomendaciones y precauciones de uso. **Conclusión:** de esta forma, se evidencia la importancia del control de calidad en los productos que contienen ácido glicólico para garantizar la seguridad y efectividad para los usuarios.

*Palabra clave:* Ácido glicólico, productos cosméticos, control de calidad.

## INTRODUÇÃO

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são considerados preparações que possuem substâncias naturais ou sintéticas, sendo utilizadas para diversas partes do corpo com a finalidade de proteção, limpeza e embelezamento [1].

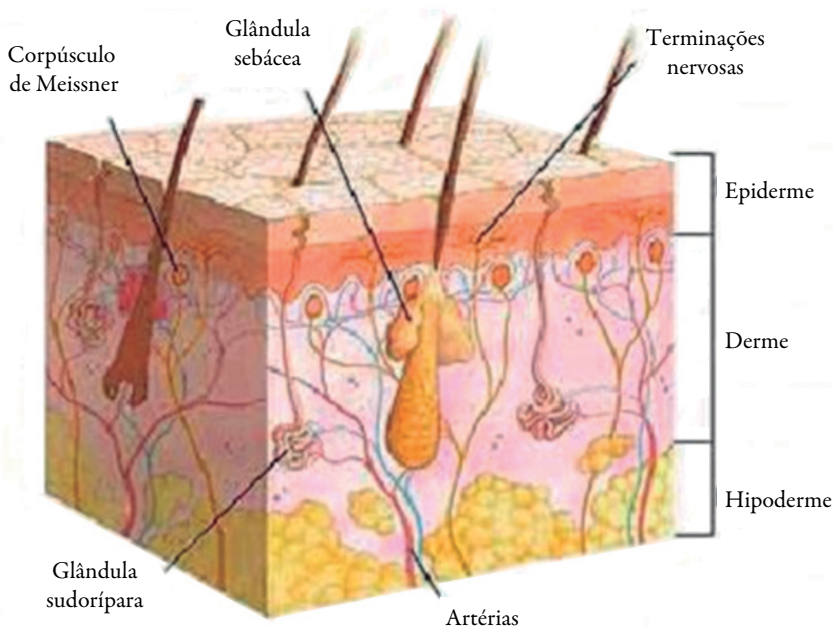
Segundo a Resolução nº 211/05 da Anvisa os produtos cosméticos que contém ácido glicólico se enquadram na categoria de produtos de grau 2, ou seja, são produtos que possuem risco em potencial, sendo necessário comprovação de segurança ou eficácia, além de orientações e cuidados com o seu uso [1].

A pele é um órgão que possui três camadas de tecido (figura 1): a epiderme (superior) constituída de epitélio estratificado pavimentoso; a derme (intermediária) formada de tecido conjuntivo (vasos, nervos, fibras de colágeno e elastina); e a hipoderme (profunda) composta de tecido gorduroso [2].

A pele tem funções de proteção constituindo uma barreira física contra atrito, microrganismos, desidratação e raios ultravioletas. Esse órgão ao mesmo tempo atua na termorregulação do corpo humano prevenindo a perda de líquidos e a penetração de substâncias exógenas [3].

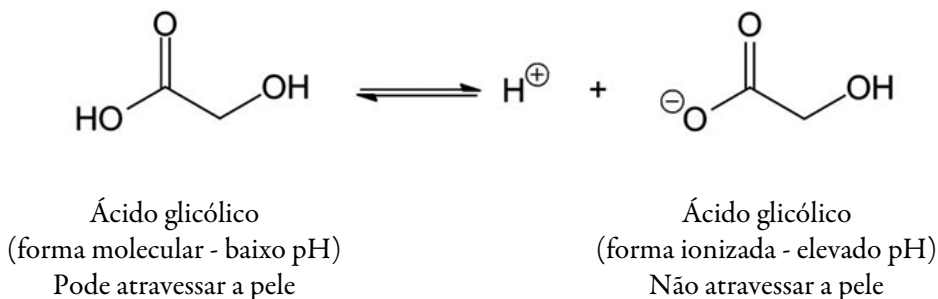
O ácido glicólico (figura 2) obtido a partir da cana-de-açúcar, é o alfa-hidroxiácido (AHA) de menor massa molar entre os representantes dessa categoria [4, 5]. A figura 2 representa a estrutura química do ácido glicólico descrito como Ácido 2-hidroxiacético, possui alta solubilidade em água e em etanol, sendo o AHA mais utilizado em formulações dermocosméticas, uma vez que seu reconhecimento na prática dermatológica já foi bem estabelecido [6, 7].





**Figura 1.** Representa um corte vertical das camadas da pele. Fonte: W.D. Rasche [2].

Por ser tratar de uma molécula pequena, o ácido glicólico penetra facilmente na pele e por isso é aplicado para o tratamento estético e dermatológico em formulações antirugas também conhecidos como *anti-aging*, esfoliantes químicos (*peeling*), agindo na descamação, melhorando a suavidade e proporcionando emoliência da pele [8]. Além de ser indicado para diferentes finalidades terapêuticas como a queratose seborreica, acne, verrugas, queratose actínica, manchas senis, envelhecimento cutâneo, melasma e outros problemas relacionados a pele [9].

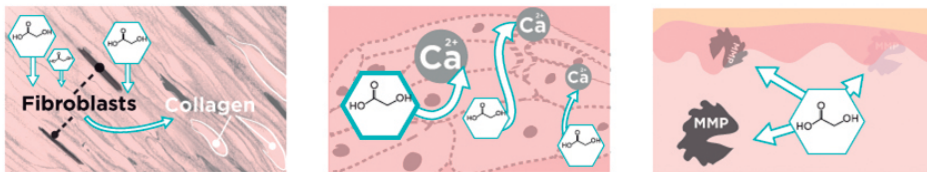


**Figura 2.** Representação da estrutura química do ácido glicólico em equilíbrio com o ânion glicolato [10].

Alguns pesquisadores recomendam o uso de ácido glicólico tamponado ou parcialmente neutralizado, que é mais segura do que a empregar ácido glicólico livre (não ionizado). O pH de uma solução não tamponada varia de 0,08 a 2,75, assim quanto maior a concentração e menor o pH, mais intenso será a descamação da pele (efeito *peeling*) [4], ou seja, a biodisponibilidade do ácido glicólico depende da concentração do pH que está sendo empregado na formulação [10].

Apesar da importância e da prevalência de ácido glicólico e outros AHAs, o mecanismo pelo qual ele atua na renovação celular ainda não é bem esclarecido, pouco se sabe sobre como AHAs causam esfoliação química que induz a produção células novas. Foi relatado a ocorrência de um receptor transitório vaniloide 3 (TRPV3), que é um canal nos queratinócitos o qual é potentemente ativado por acidificação intracelular oriunda do ácido glicólico ou de outro AHA e essa acidificação, por sua vez, promove a morte dos queratinócitos fazendo com que ocorra renovação celular [11].

A figura 3 ilustra outro possível mecanismo de ação do ácido glicólico na renovação celular dérmica:



1. O ácido glicólico estimulam os fibroblastos a produzirem colágeno.
2. O ácido glicólico removem ions cálcio na epiderme e das adesões celulares da pele.
3. O ácido glicólico causa a degradação das metaloproteinasas (MMPs) da matriz.

**Figura 3.** Mecanismo de ação do ácido glicólico na renovação celular. Fonte: FutureDerm® [12].

Uma teoria para o mecanismo de ação de AHAs aplicado topicamente é proposta com base em uma análise com os dados experimentais e clínicos. Os AHAs reduzem a concentração de íons de cálcio da epiderme e das junções celulares por mecanismo de quelatação. As junções celulares dermossômicas permanecem firmemente ligadas quando na presença de íons cálcio e outros íons divalentes. As adesões celulares quando interrompidas, resultam em descamação. A descamação é reforçada pela clivagem da enzima quimotripética do estrato córneo endógeno nas caderinas desmossomais, que conjugadas aos íons cálcio ficam protegidas da proteólise. Portanto, a diminuição do nível de íons de cálcio na epiderme tende a promover o crescimento celular e retardar a diferenciação celular, dando origem a uma pele mais jovem. Devido a essa propriedade

dos AHAs sugere que seja necessário tomar cuidado com o uso excessivo e crônico desses compostos [13].

Considerando a grande utilização das AHAs e seus derivados em produtos cosméticos a Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC) recomenda concentração máxima permitida em produtos cosméticos, limitada a 10%, calculada na forma ácida, e pH maior ou igual a 3,5, além das recomendações de uso e precauções na rotulagem do produto [14].

É importante tomar os cuidados necessários com a utilização desses cosméticos, principalmente pessoas com pele sensível, uma vez que, as ações dos ácidos podem causar eritema, inchaço, queimação, coceira, descoloração da pele. Além disso, a pele pode tornar-se sensível aos raios ultravioletas sendo necessária a utilização de um cosmético com foto proteção [9].

Tendo em vista as inúmeras aplicabilidades desses produtos contendo (AHAs), é de grande importância realização de testes de controle de qualidade, para a garantia de que os níveis de ácido glicólico estejam em conformidade com os critérios estabelecidos pela Anvisa [14] a fim de proporcionar segurança e eficácia aos usuários que utilizam esses cosméticos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico disponíveis no comércio nacional. Para isso, foram realizados o teste da análise do rótulo, das características organolépticas dos produtos, determinação do pH, teste de centrifuga e do doseamento do ácido glicólico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas oito amostras de produtos cosméticos contendo ácido glicólico. Das 8 adquiridas, 6 eram semi-sólidas sendo classificadas em (ASS1, ASS2, ASS3, ASS4, ASS5 e ASS6) e 2 eram líquidas (AL7 e AL8).

Os reagentes utilizados nos ensaios analíticos foram: água destilada, previamente purificada pelo sistema de purificação de água Quimis® modelo Q-341-25, etanol (EtOH) 95% Dinâmica® e solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Os ensaios analíticos empregados na avaliação da qualidade dos produtos cosméticos foram realizados de acordo com o parecer técnico nº 7 de 2001 [14], *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos* [15], *Guia de estabilidade de produtos cosméticos* [16] e como preconizado por Henriques *et al.* [7] encontram-se descritos abaixo:

### **Análise do rótulo**

Foram examinados os rótulos de cada amostra, dando ênfase nos itens relacionados a concentração máxima, data de fabricação e validade, modo de uso e advertências que devem constar no rótulo de acordo com a legislação vigente [14].

### **Análise organoléptica**

Esta análise foi realizada com auxílio de uma lupa, sendo observados o aspecto, cor, textura e aparência de cada amostra. Além do odor, possibilitando o reconhecimento primário do produto [15].

### **Determinação do pH**

Foram realizadas leituras em triplicata para cada amostra, utilizando medidor de pH de bancada (modelo UB-10 - Denver Instrument<sup>®</sup>) devidamente calibrado com a solução-tampão de pH 4,0 e 7,0. O pH foi determinado através da imersão do eletrodo diretamente nas amostras. Após a obtenção dos resultados, foram calculadas as médias aritméticas e os desvios-padrão (DP) de cada amostra [15].

### **Teste de centrífuga**

As amostras testadas nesta análise foram às formulações semissólidas, utilizando a centrífuga de bancada (Centribio<sup>®</sup>). Foram pesados 1 g de cada amostra em balança analítica (Shimadzu Ay 220) e colocados em tubo de ensaio a 3000 rpm durante 30 min [16].

### **Doseamento do ácido glicólico**

Conforme o método descrito no *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos* o teor do ácido glicólico foi determinado por titulação de neutralização ácido-base, que é baseada na reação completa entre um ácido e uma base (reação de neutralização).

Para cada amostra pesou-se 1g do creme ou solução líquida. Em seguida, foram adicionados 50 mL de uma solução EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) homogeneizando a solução. Posteriormente, adicionou 3 gotas do indicador fenolftaleína. Logo após, realizou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (fator de correção de 1,05) [7], sendo a análise realizada em triplicata.

Para o cálculo do teor do ácido glicólico, utilizou-se a equação 1 descrita abaixo, conforme recomendado no *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos* [15].

$$C = \frac{V \times Fc \times 0,7605 \times 100}{m} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:  $C$  = concentração (p/p) de ácido glicólico,  $V$  = volume de hidróxido de sódio 0,1 N gasto, em mililitros (mL),  $Fc$  = fator de correção do titulante, e  $m$  = massa da amostra em gramas (g).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise do rótulo

A análise do rótulo foi realizada em todas as oito amostras dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico.

De acordo com o parecer técnico nº 7 de 2001, nos produtos de grau 2 contendo AHAs e seus derivados enxaguáveis deve estar descrito para não aplicar na região dos olhos, enxaguar a pele após concluída a aplicação, se houver a ocorrência de efeitos indesejáveis não persistir no uso. Nas primeiras aplicações utilizar pequenas quantidades do produto e em dias alternados, sendo que pode ocorrer sensação de ardor, pinicação ou ressecamento da pele. Além disso, deve constar no rótulo as precauções de manter fora do alcance de crianças, não ingerir, caso entrar em contato com os olhos enxaguar abundantemente, em caso de irritação suspender o uso do produto e procurar orientação médica [14].

Diante de tais recomendações e precauções, apenas as amostras ASS1, ASS2, AL7 e AL8 estão de acordo com parecer técnico da Anvisa. Com relação à amostra ASS3 na bula sugere recomendações de uso, mas não faz menção ao uso de fotoproteção durante o tratamento, bem como outras medidas de proteção em caso de irritação.

No que diz respeito às amostras ASS4, ASS5 e ASS6 trata-se de produtos manipulados adquiridos no mercado nacional, no rótulo não constava nem as recomendações e nem as precauções do uso do produto, apenas alerta para usar conforme orientação médica.

Vale salientar que todas as amostras analisadas continham em sua embalagem o lote ou data de fabricação e data de validade, sendo que todas estavam dentro do tempo de vida útil do produto.

### Características organolépticas

Os resultados alcançados nos ensaios organolépticos das amostras analisadas encontram-se na tabela 1.

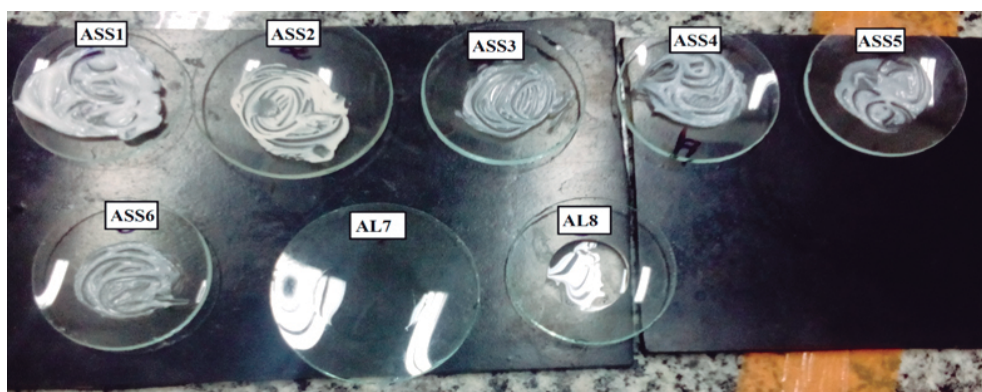
A figura 4 ilustra as amostras analisadas no presente trabalho dispostas em vidro relógio, afim de verificar as características organolépticas.

**Tabela 1.** Características organolépticas dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico analisados.

Amostras	Ensaio				
	Aparência	Cor	Odor	Textura	Aspecto
ASS1	UB	B	LCP	NGA	C
ASS2	UO	BG	LC	NGPA	C
ASS3	UB	B	LCP	NGA	C
ASS4	UB	B	LCP	NGA	C
ASS5	UB	B	LC	NGA	C
ASS6	UB	B	LC	NGA	C
AL7	UB	I	LCP	NGA	V
AL8	UB	I	LCP	NGA	V

UB: úmida brilhosa; UO: úmida opaca; B: branco; BG: bege; I: incolor; LC: leve característico; LCP: leve característica perfumada; NGA: não há grumos e arenosidades; NGPA: não há grumos e há presença de arenosidades; C: cremosa; V: viscoso; ASS1-ASS6: amostra semissólida; AL7-AL8: amostra líquida.

As formulações analisadas foram avaliadas com relação a cor, aspecto, odor, textura e aparência, conforme a tabela 1. Sendo que, não foram observadas alterações em tais características, como separação de fase, precipitação e turvação.



**Figura 4.** Análise organoléptica dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico.

Em relação à aparência as amostras ASS1, ASS3, ASS4, ASS5, ASS6, AL7 e AL8 apresentaram úmida brilhosa, enquanto a amostra ASS2 mostrou-se úmida opaca.

Já as amostras ASS1, ASS3, ASS4, AL7 e AL8 possuíam odor levemente característico perfumado, sendo que, as amostras ASS2, ASS5 e ASS6 apresentou odor leve característico sem perfume.

Quanto à textura das amostras ASS1, ASS3, ASS4, ASS5, ASS6, AL7 e AL8 não apresentaram grumos e nem arenosidades. Enquanto, a amostra ASS2 não possuía grumos, mas foi possível verificar arenosidade na formulação. Essa arenosidade pode ser devido a presença de argila mencionada como componente secundário da formulação com finalidade de promover a esfoliação da pele.

Considerando que as características do produto têm forte impacto para o consumidor final, a finalidade dessa análise é garantir que eles possuam a qualidade e segurança almejada [17].

### **Determinação do pH**

A análise do pH é de suma importância para a segurança dos consumidores, visto que, o ácido glicólico é um alfa-hidroxiácido e em valores baixos de pH podem causar irritação dérmica [14].

Além disso, a Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC) recomenda que em produtos cosméticos contendo AHAs e seus derivados a formulação deve conter pH maior ou igual a 3,5 e menor ou igual a 5,0, para produtos qualificado como produto de grau 2 [14].

No que diz respeito aos produtos cosméticos testados pode-se notar que as amostras ASS2, ASS3, ASS4 e AL8 estão dentro do limite permitido. No entanto, as amostras ASS1, ASS5, ASS6 e AL7 estão com valores de pH abaixo do permitido pela legislação que é de maior ou igual a 3,5 e menor ou igual a 5,0, conforme apresenta a tabela 2.

Considerando que o ácido glicólico tem mais facilidade de penetração na pele do que outros AHAs devido ao tamanho molecular, isso o torna preferível para ser empregado em produtos cosméticos. Assim, o pH da formulação é um parâmetro mais importante do formulado, a literatura científica tem mostrado que o pH 3,5 proporciona melhor regeneração celular e que valores abaixo desse valor o ácido glicólico torna-se mais ácido e maior a chance de irritação e lesão da pele [7, 18].

As consequências de um pH abaixo do estabelecido pela Anvisa para produtos cosméticos contendo AHAs e seus derivados podem causar implicações como, eritema, inchaço, queimação, descoloração da pele, dentre outras sequelas [9].

**Tabela 2.** Resultados das determinações do pH em produtos cosméticos contendo ácido glicólico.

Amostras	pH ± DP*
ASS1	3,18 ± 0,02
ASS2	3,69 ± 0,02
ASS3	4,18 ± 0,04
ASS4	3,78 ± 0,07
ASS5	3,15 ± 0,03
ASS6	3,34 ± 0,03
AL7	3,43 ± 0,02
AL8	3,91 ± 0,00

\*Média de três determinações ± desvio padrão (DP); ASS1-ASS6: amostras semissólidas; AL7-AL8: amostras líquidas.

### Teste de centrífuga

As amostras semissólidas ASS1-ASS6 foram submetidas ao teste da centrífuga para avaliar a estabilidade física dos cremes, como, precipitação, separação de fases, formação de um sedimento compacto (*caking*) e fusão das partículas (coalescência) [16].

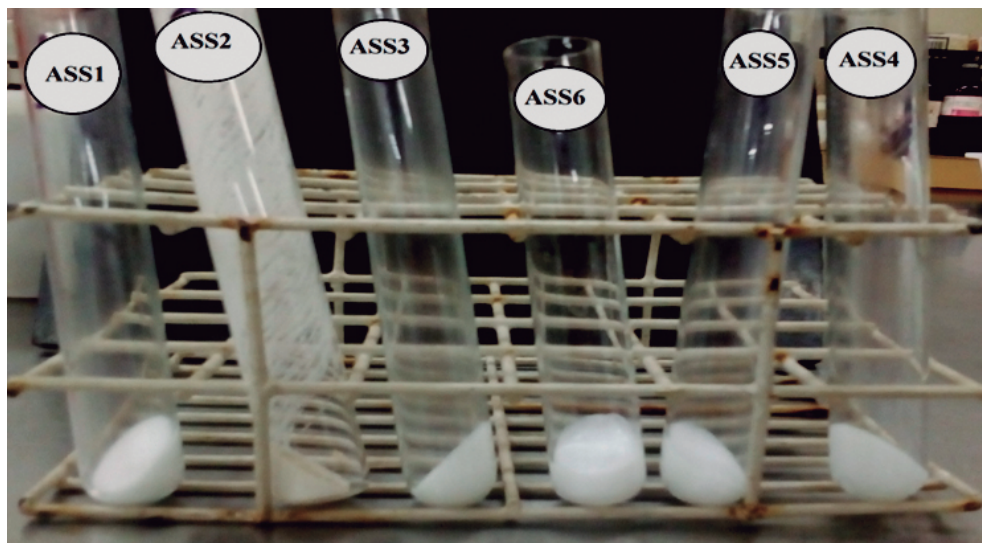
Ao final do teste as seis amostras semissólidas analisadas mantiveram-se estáveis, não sendo observadas alterações físicas, o que demonstra e apresenta qualidade quanto a esse parâmetro, conforme ilustrado na figura 5.

### Doseamento do ácido glicólico

O doseamento do ácido glicólico foi realizado por método titulométrico de neutralização ácido-base, que dependendo da concentração de cada solução um anula o efeito do outro [19]. Sendo assim, é uma análise que procura determinar uma quantidade desconhecida do analito (ácido glicólico) por meio da adição de uma solução titulante de concentração conhecida (NaOH 0,1N), que reage com a substância a qual se pretende determinar a concentração com auxílio de um indicador visual de pH fenolftaleína [20].

Os resultados da análise de teor e desvio padrão do ácido glicólico estão apresentados na tabela 3.





**Figura 5.** Amostras semissólidas de produtos cosméticos com ácido glicólico após o teste de centrifuga.

Em relação à quantificação do ácido glicólico, observa-se que todas as oito amostras estão de acordo com o especificado na Anvisa, uma vez que permaneceram dentro limite estabelecido de 10% de ácido glicólico em produtos cosméticos [14].

**Tabela 3.** Resultados das determinações do teor de ácido glicólico em produtos cosméticos.

Amostras	Teor de ácido glicólico (%p/p) $\pm$ DP*
ASS1	2,28 $\pm$ 0,17
ASS2	8,99 $\pm$ 0,40
ASS3	6,42 $\pm$ 0,24
ASS4	5,63 $\pm$ 0,83
ASS5	5,78 $\pm$ 0,04
ASS6	9,23 $\pm$ 0,05
AL7	4,30 $\pm$ 0,03
AL8	5,39 $\pm$ 0,17

\*Média de três determinações  $\pm$  desvio padrão (DP); ASS1-ASS6: amostras semissólidas; AL7-AL8: amostras líquidas.

A concentração do ácido glicólico quando utilizado em baixas concentrações 2 a 10% tem finalidade de tratar acne, queratose actínica, hiperchromias, rugas. Já em concentrações maiores tem como objetivo o efeito *peelings*, que estimula a remoção da camada externa da pele e pôr fim à renovação celular da pele [21].

Contudo devem-se tomar certos cuidados com a utilização desse ácido em concentrações maiores principalmente com o tempo de aplicação, pois pode desencadear efeitos indesejáveis, como eritema, hiperpigmentação, cicatrizes hipertróficas, alterações dérmicas, dentre outras consequências [21, 22].

Tendo em consideração todos os testes de controle de qualidade aplicado aos produtos cosméticos contendo ácido glicólico em sua formulação, observa-se que são análises de fácil realização e de baixo custo. Sendo imprescindível sua realização para garantir um produto de qualidade e de segurança comprovada aos consumidores finais.

## CONCLUSÃO

Com relação às análises realizadas apenas quatro de oito amostras apresentou pH abaixo do estabelecido pela Anvisa. Quanto à análise de rótulo as amostras manipuladas amostras não constam das recomendações e precauções de uso que são necessários para o produto, enquanto a amostra ASS3 não constava as precauções de uso do produto, como o uso de foto proteção e as medidas de proteção em caso de irritação.

No que se refere às análises de teor as oito amostras foram aprovadas, pois permaneceram dentro do limite de 10% estabelecido pela Anvisa para produtos contendo AHAs e seus derivados.

Portanto, conforme os resultados apresentados ficam evidente a importância da realização do controle de qualidade dos produtos cosméticos contendo ácido glicólico, além de maior fiscalização dos produtos manipulados pela falta de informações no rótulo, para garantir o bem-estar, segurança e eficácia para os consumidores. Além disso, vale ressaltar que o método empregado é simples, de baixo custo, de fácil aplicabilidade e reprodução, podendo ser realizado por farmácias de manipulação no controle de qualidades dos produtos contendo o ácido glicólico.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 211 de 14 de julho de 2005.
2. W.D. Rasche, *Formulação e análise de gel-creme hidratante facial*, Trabalho final, Centro Universitário Univates, 2014, p. 3.
3. R.C. Moi, *Envelhecimento do sistema tegumentar: Revisão sistemática da literatura*, Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2004, pp. 13-14.
4. J. Sharad, Glycolic acid peel therapy. A current review, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, **6**, 281-288 (2013).
5. A.R. Fiorucci, M.H.F.B. Soares, E.T.G. Cavalheiro, Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano, *Química Nova na Escola*, **15**, may (2002).
6. Acofarma, Ficha de informação técnica, ácido glicólico, URL: [http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/6304-5446e45907a7cee1bc025c98b-6fcb660ec52f4ba/main/files/Acido%20glic%C3%B3lico\\_022302a\\_PT.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/6304-5446e45907a7cee1bc025c98b-6fcb660ec52f4ba/main/files/Acido%20glic%C3%B3lico_022302a_PT.pdf), acessado em janeiro de 2018.
7. B.G. Henriques, V.P. Sousa, N.M. Volpato, S. Garcia, Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do teor de ácido glicólico na matéria-prima e em formulações dermocosméticas, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **43**, 39-45 (2007).
8. M.C.M. Reis, R.P. Neto, S.A. Medeiro, Aplicações dos alfas hidroxiácidos na cosmética dermatológica – Alpha hydroxyacids applications in dermatological cosmetic, *Cadernos de Estudos e Pesquisas*, **18**, 40 (2014).
9. P. Nardin, S.S. Guterres, Alfa-hidroxiácidas: Aplicações cosméticas e dermatológicas, *Caderno de Farmácia*, **15**(1), 7-14 (1999).
10. Lab Muffin, The Science of beauty, explained simply, 2014. URL: <https://lab-muffin.com/fact-check-friday-why-does-ph-matter-for-ahas-and-bhas/>, acesso em: 06 fev. 2018.
11. X. Cao, F. Yang, J. Zheng, K. Wang, Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of alpha hydroxyl acids on keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**(31), 25905-25916 (2012).

12. FutureDerm®, 2014. URL: <https://www.futurederm.com/spotlight-glycolic-acid/>, acesso em: 06 fev. 2018.
13. X. Wang, A theory for the mechanism of action of the alpha-hydroxy acids applied to the skin, *Medical Hypotheses*, **53**, 380-382 (1999).
14. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Utilização de alfa-hidroxiácidos em produtos cosméticos*, Parecer técnico nº 7, de 28 de setembro de 2001.
15. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos*, Anvisa, Brasília, 2007, pp. 69-70.
16. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*, v. 1, Série Temáticas, Anvisa, Brasília, 2004, p. 17.
17. G. Bontorim, *Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise*, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2009, p. 48.
18. M.V.R. Velasco, M.E. Ribeiro, V. Bedin, F.R. Okubo, D. Steiner, Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol. *Anais Brasileiros de Dermatologia* (Rio de Janeiro), **79**(1), 91-99 (2004).
19. D.J. Maia, J.C.A. Bianchi, *Química geral. Fundamentos*, Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2007, p. 127.
20. A.S. Cuchinski, J. Caetano, D.C. Dragunski, Extração do corante da beterraba (*Beta vulgaris*) para utilização como indicador ácido-base, *Ecletica Química* (São Paulo), **35**(4), 17-18 (2010).
21. A.F. Ribeiro, L. Castilho, Avaliação de métodos de mistura magistrais para incorporação de ácido glicólico em base semi-sólida, *Infarma*, **22**(1/4), 23-27 (2010).
22. M. Cação, F.B. Fernandes, M. Chorilli, Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações despigmentantes acrescidas de ácido glicólico contendo pectina como espessante, *Revista Brasileira de Farmácia*, **90**(3), 272-280 (2009).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

P. de Oliveira-Centurião, P. Espinosa dos Santos, A. Marques-Rosa, N. Mohamad-Kassab, Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 158-173 (2021).

# A descrição matemática da detecção eletroquímica da ergina, assistida pelos novos derivados triazólicos, dopados pelo íon amavadina

Volodymyr V. Tkach<sup>1,2</sup>, Marta V. Kushnir<sup>1</sup>, Sílvio C. de Oliveira<sup>2</sup>, Volodymyr V. Parchenko<sup>3</sup>, Vira M. Odyntsova<sup>3</sup>, Ilona I. Aksyonova<sup>3</sup>, Yana G. Ivanushko<sup>4</sup>, Petro I. Yagodynets<sup>1</sup>, Zholt O. Kormosh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrânia.

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

<sup>3</sup> Universidade Estatal de Medicina de Zaporizhzhya, 69000, Av. de Maiakovs'ky, 26, Zaporizhzhya, Ucrânia.

<sup>4</sup> Universidade Estatal de Medicina de Bucovina, 58000, Pça. Teatral, 9, Chernivtsi, Ucrânia.

<sup>5</sup> Universidade Nacional do Leste Europeu, 43000, Av. da Liberdade, 13, Luts'k, Ucrânia.

\*Autor para correspondência: [nightwatcher2401@gmail.com](mailto:nightwatcher2401@gmail.com)

Recebido: 13 de agosto de 2019

Revisado: 14 de outubro de 2020

Aceto: 16 de outubro de 2020

## RESUMO

**Introdução:** pela primeira vez, o processo eletroanalítico da detecção da ergina (LSA) sobre um eletrodo, modificado por um derivado triazólico, dopado pelo íon amavadina, tem sido descrito teoricamente. **Métodos:** o modelo matemático, correspondente ao desempenho do sensor, tem sido desenvolvido e analisado do ponto de vista da teoria de estabilidade linear. Foi mostrado que a amavadina pode servir de modificador eficiente para a detecção eletroanalítica da ergina. Outrossim, a presença de um material orgânico no modificador reforça a capacidade da ergina de polimerizar-se, formando um composto polimérico. **Resultados:** os comportamentos oscilatório e monotônico são mais prováveis que no caso mais comum, haja vista a formação-deformação de compostos iônicos aquando da detecção eletroanalítica.

*Palavras-chave:* Ergina, sensor eletroquímico, triazóis, amavadina, polímeros condutores, estado estacionário estável.

## SUMMARY

### The mathematical description for the ergin electrochemical detection, assisted by amavadin ion doped triazolic derivatives

**Introduction:** For the first time, the electroanalytical process of ergin (LSA) determination over an electrode, modified by triazolic derivative, doped by an amavadin-ion, has been theoretically described. **Methods:** The mathematical model, correspondent to the sensor function, has been developed and analyzed by means of linear stability theory. It has been shown that the amavadin may serve as an efficient electrode modifier for the electroanalytical detection of ergin. Moreover, the presence of an organic material as electrode modifier reinforces the possibility of ergin polymerization, yielding a polymer composite. **Results:** The oscillatory and monotonic behavior is more probable than in the common case, considering the formation and destruction of the ionic compounds during the electroanalytical detection.

*Keywords:* Ergin, electrochemical sensor, triazoles, amavadin, conducting polymers, stable steady-state

## RESUMEN

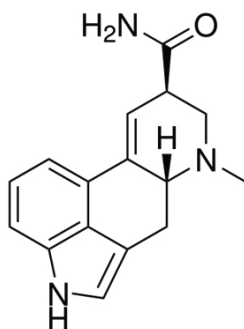
### Descripción matemática de la detección electroquímica de ergina, asistida por los nuevos derivados de triazol, dopados por el ión amavadina.

**Introducción:** por primera vez se ha descrito teóricamente el proceso eletroanalítico de detección de ergina (LSA) en un electrodo, modificado por un derivado triazólico, dopado por el ión amavadina. **Métodos:** el modelo matemático, correspondiente al rendimiento del sensor, ha sido desarrollado y analizado desde el punto de vista de la teoría de la estabilidad lineal. Se ha demostrado que la amavadina puede servir como un modificador eficaz para la detección eletroanalítica de ergina. Además, la presencia de un material orgánico en el modificador refuerza la capacidad de la ergina para polimerizar, formando un compuesto polimérico. **Resultados:** los comportamientos oscilatorios y monótonos son más probables que en el caso más común, dada la formación-deformación de compuestos iónicos durante la detección eletroanalítica.

*Palabras clave:* Ergina, sensor electroquímico, triazoles, amavadina, polímeros conductores, estado estacionario estable.

## INTRODUÇÃO

A ergina (LSA, amida do ácido lisérgico, (8 $\beta$ )-9,10-dideído-6-metilo-ergolino-8-carboxamida, número CAS 478-94-4) (figura 1) é um composto psicotrópico de caráter sedativo [1-4]. Os primeiros registros do seu uso vão desde os estados mesoamericanos, que usavam as plantas, que continham a ergina, para ritos religiosos, em que com a sonolência indicada, alegadamente, vinha a perdão de todos os pecados e(ou) esquecimento total. A ergina tem composição bastante semelhante à da droga conhecida LSD.

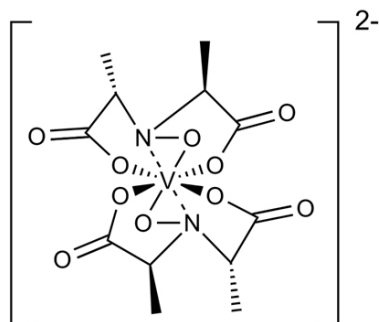


**Figura 1.** Estrutura molecular de ergina.

A sua atividade biológica é dependente de dose. Já 50  $\mu$ g da substância causam cansaço, falhas de memória e faltas nas funções cognitivas. Por outro lado, o seu excesso levará à manifestação de euforia descontrolável e alucinações. Malgrado o uso da ergina não cause a dependência, a maioria dos países considera a ergina como droga, com as consequências do seu tráfico, previstas por lei [3, 4]. O uso medicinal da substância é, destarte, condicionado a receita médica. Outrossim, o seu uso pelos desportistas é banido por regulamento da federação desportiva correspondente e por lei (quando aplicável). Destarte, a elaboração de um método da detecção da ergina é, sem dúvida, atual [5-8], e o uso dos métodos eletroanalíticos poderia dar bom serviço [9, 10].

Sendo a ergina um derivado de indol, substituído por um grupo doador, ela é eletroquimicamente ativa. Ademais, a sua composição deixa pressupor que o íon amavadina (figura 2), isolado do cogumelo mata-moscas, onde desempenha função de oxidante natural [11, 12], pode ser um modificador eficiente para a detecção da ergina:





**Figura 2.** Estrutura molecular de amavadina.

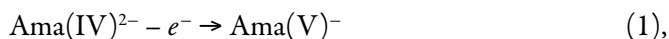
A modificação do eléctrodo pela amavadina é realizada por meio da sua inserção numa matriz, porque o cátodo está coberto. A matriz pode ser baseada nos compostos com nitrogênio piridínico, como os triazóis [13, 14], capazes de estabilizar a amavadina, formando um sal com ela.

Malgrado o supracitado, o desenvolvimento prático de um processo eletroanalítico, requer, *a priori*, uma investigação teórica comportamental do sistema, com a análise do modelo matemático correspondente. Esta análise poderá fornecer-nos resposta a perguntas, que surgem da indecisão acerca do mecanismo mais provável do desempenho eletroanalítico do sistema, da possibilidade das instabilidades eletroquímicas, não necessariamente desejáveis para o desempenho eletroanalíticos [15, 16] e, ademais, da mera comparação entre este processo eletroanalítico e os já descritos [17, 18].

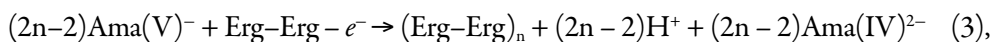
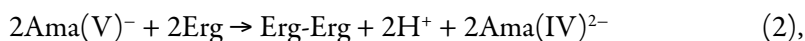
Destarte, o objetivo geral do nosso trabalho é avaliar, do ponto de vista teórico o processo da detecção eletroanalítica da ergina por um ânodo, modificado por um composto triazólico dopado pelo íon amavadina. A sua realização far-se-á mediante o desenvolvimento e a análise comportamental de estabilidade do modelo matemático, correspondente ao sistema. Ademais, comparar-se-ão este sistema e os análogos, com ênfase às diferenças mecanísticas e do desempenho [19-21].

## O SISTEMA E O SEU MODELO

Na primeira etapa, o átomo de vanádio, que fica no centro do íon amavadina, é oxidado, rendendo a amavadina(V), conforme (1):



Sendo Ama(IV) e Ama(V) as amavadinas inicial e oxidada. Esta entra na reação com o analito (ergina) oxidando-o até formar o radical-cátion (e, por conseguinte, o dímero) e recuperando aquela (2-3). O cenário da polimerização da ergina não é descartável não só por causa de o potencial da oxidação do dímero ser inferior do potencial da dimerização do monômer, mas também por serem os íons amavadina intercalados numa superfície orgânica, que promove a adesão da camada polimérica sobre o ânodo, assim como se observou durante a determinação da pesticida isoproturona sobre o polipirrol [19], o que foi observado não só experimental [19], mas também teoricamente para a determinação direta [20] e indireta [21].



Destarte, para descrever o comportamento do sistema eletroanalítico da determinação eletroanalítica da ergina, assistida pelo composto triazólico, dopado pela amavadina, introduzimos as três variáveis:

$\varepsilon$ : a concentração da ergina na camada pré-superficial;

$\varepsilon^*$ : a concentração do dímero da ergina na camada pré-superficial;

$\theta$ : o grau de recobrimento da superfície do ânodo pela amavadina na sua forma oxidada.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja agitando-se intensamente, o que nos deixa menosprezar o fluxo de convecção e as suas influências. Outrossim, supomos que o eletrólito de suporte esteja em excesso, o que nos permite menosprezar o fluxo de migração e as suas influências. Ademais, supomos que o perfil da distribuição de concentrações das substâncias na camada pré-superficial seja lineal, e a espessura da camada, estável, igual a  $\delta$ . Além disso, para simplificar a modelagem, *a priori*, não incluímos no modelo a participação do monômero da eletropolimerização do dímero (esta será incluída no modelo para um analito análogo num dos nossos próximos trabalhos).

Destarte, o comportamento do sistema será descrito pelo conjunto de equações diferenciais de balanço (CEDB), conforme (4):

$$\begin{cases} \frac{d\varepsilon}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Sigma}{\delta} (\varepsilon_0 - \varepsilon) - r_2 \right) \\ \frac{d\varepsilon^*}{dt} = \frac{2}{\delta} (r_2 - r_3) \\ \frac{d\theta}{dt} = \frac{1}{\alpha} (r_1 - r_2 - r_3) \end{cases} \quad (4)$$

Sendo  $\Sigma$  o coeficiente de difusão da ergina,  $\varepsilon_0$  a concentração da ergina no interior da solução,  $\alpha$  é a concentração superficial máxima da amavadina na superfície do ânodo modificado e os parâmetros  $r$  são as velocidades das reações correspondentes, que se podem calcular conforme:

$$r_1 = k_1 (1 - \theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (5)$$

$$r_2 = k_2 \varepsilon \theta \exp(-\beta\theta) \quad (6)$$

$$r_3 = k_3 \varepsilon^* \theta \exp(-\beta\theta) \quad (7)$$

em que os parâmetros  $k$  são as constantes de velocidade das respectivas reações,  $\beta$  é uma variável, que descreve as influências entre a capacitância da dupla camada elétrica (DCE) e o grau de recobrimento da superfície pela forma oxidada da amavadina,  $F$  é o número de Faraday,  $R$  é a constante universal de gases e  $T$ , a temperatura absoluta.

Em princípio, temos um sistema, em que há, de fato, a eletrooxidação gradual assistida do analito. Sem embargo, o serem os processos eletroanalíticos assistidos pelos compostos iônicos faz com que se influencia fortemente a DCE aquando do processo. Essas influências têm valor importante para o comportamento do sistema, o que será descrito abaixo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para descrever o comportamento do sistema com a detecção eletroanalítica da ergina, assistida pela amavadina, analisamos, mediante a teoria de estabilidade linear e da análise de bifurcações o CEDB (4), havendo vista as relações algébricas (5-7). Os elementos estacionários da matriz funcional de Jacobi podem ser descritos conforme:

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

sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{\Sigma}{\delta} - k_2 \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (9)$$

$$a_{12} = 0 \quad (10)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} \left( -k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) + \beta k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) \right) \quad (11)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} \left( k_2 \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (12)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} \left( -k_3 \varepsilon * \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (13)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} \left( k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) - \beta k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) - k_3 \varepsilon * \exp(-\beta \theta) + \beta k_3 \varepsilon * \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (14)$$

$$a_{31} = \frac{1}{\alpha} \left( -k_2 \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (15)$$

$$a_{32} = \frac{1}{\alpha} \left( -k_3 \varepsilon * \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (16)$$

$$a_{33} = \frac{1}{\alpha} \left( -k_1 \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - \xi k_1 (1-\theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) + \beta k_2 \varepsilon \exp(-\beta \theta) - k_3 \varepsilon * \exp(-\beta \theta) + \beta k_3 \varepsilon * \theta \exp(-\beta \theta) \right) \quad (17)$$

Tendo em conta os elementos da diagonal principal (9), (13) e (17), é possível confirmar que o *comportamento oscilatório*, neste caso, é possível. É mais provável que no caso da detecção, assistida por um óxido ou oxihidróxido de metal [19, 0], por haver mais fatores, que influenciam o comportamento da DCE, mas menos provável que no caso da eletrodeteção e eletropolimerização direta [21], por não haver instabilidades superficiais.

Além do elemento  $\xi k_1 (1-\theta) \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) > 0$ , caso  $\xi < 0$ , que descreve as influências da etapa eletroquímica na capacitância da DCE, responsáveis pela aparição da positiva conexão de retorno (e, por conseguinte, o comportamento oscilatório), existe, também o par de elementos  $\beta(r_2 + r_3)$ , que descreve a influência das mudanças periódicas do valor da capacitância da DCE, que se observam aquando da transformação mútua das formas iônicas da amavadina. As oscilações se preveem mais frequentes e menos amplas que e [20], mas menos frequentes e mais amplas que em [21].

Para investigar a *estabilidade do estado estacionário*, aplicamos ao CEDB (4) o critério Routh-Hurwitz. Evitando a aparição de expressões grandes, introduzimos as novas variáveis, fazendo que o determinante da matriz se descreva conforme:

$$\frac{2}{\delta\alpha} \begin{vmatrix} -\kappa - \Omega & 0 & -\Gamma \\ \Omega & -\Lambda & \Gamma - Z \\ \Omega & -\Lambda & -P - \Gamma - Z \end{vmatrix} \quad (18)$$

Abrindo os parênteses e aplicando a condição  $\text{Det } J < 0$ , saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário, expresso conforme:

$$(-\kappa - \Omega)(\Lambda P + 2\Lambda\Gamma) < 0 \quad (19)$$

O primeiro multiplicador só pode ter (do ponto de vista do senso físico dos fatores, a que se referem) valores negativos. Destarte, a expressão inteira do lado esquerdo da inequação (19) só pode ter valores negativos, sendo positivo o outro multiplicador. Isto se realiza, quando as influências da DCE dos processos eletroquímico e químico da dimerização têm menos efeito que o efeito estabilizador da transformação equirítmica das substâncias.

Vale a pena mencionar que o elemento, que é correspondente à polimerização do dímero, é excluído da inequação final. Assim, a estabilidade do estado estacionário, bem como a instabilidade monotônica, ficam indiferentes às influências da eletropolimerização do dímero.

Havendo vista o supracitado, poder-se-á concluir que se trata de um sistema eletroanalítico eficiente, controlado pela difusão da ergina. Não havendo reações laterais, capazes de comprometer a estabilidade do analito e(ou) modificadores (o que se realiza neste caso), do ponto de vista eletroanalítico, a estabilidade do estado estacionário é correspondente à dependência linear entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do analito.

A condição da instabilidade monotônica, relativa ao limite de detecção, para este sistema descreve-se conforme:

$$(-\kappa - \Omega)(\Lambda P + 2\Lambda\Gamma) = 0 \quad (20)$$

que, devido à não nulidade do primeiro multiplicador, será simplificada até (21):

$$(\Lambda P + 2\Lambda\Gamma) = 0 \quad (21)$$

Neste ponto, realiza-se a igualdade das influências estabilizadoras a desestabilizadoras.

Este modelo é útil para descrever o caso geral da eletropolimerização assistida de um monômero, obtido pela eletrossíntese assistida pelo mesmo íon. Porém, no caso mais geral dos derivados de indol, substituídos pelos grupos doadores, a participação do monômero inicial da polimerização do dímero não é descartada. Este caso vai ser descrito num dos nossos próximos trabalhos.

O produto da polimerização é, de fato, um composto polimérico, em que a amavadina será intercalada entre as duas camadas orgânicas. Este material por si só pode ser usado em sistemas eletroanalíticos tanto como substância ativa como mediador. O seu uso também será descrito posteriormente pelo nosso grupo.

## CONCLUSÕES

Da análise teórica do processo da determinação eletroanalítica da ergina (LSA), assistida pelo sal de um derivado triazólico com a amavadina foi possível concluir que:

- Em se tratando da determinação da ergina, o íon amavadina é um modificador eficiente para a sua detecção e eletropolimerização;
- O processo eletroanalítico é controlado pela difusão do analito;
- O estado estacionário estável mantém-se facilmente, sendo correspondente à linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico e a concentração;
- O comportamento oscilatório, neste caso, é mais provável que no sistema da detecção e polimerização, assistida por um óxido de metal, mas menos provável que no caso da eletrooxidação direta.

## CONFLITO DE INTERESSE

Todos os autores relatam que não têm nenhum conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. C. Ponté, M. Lapeyre-Mestre, Psychoactive effects of 'legal high': About lysergic acid amide (LSA), *Thérapie*, **72**, 605-608 (2017).

2. S. Legriél, F. Bruneel, O. Spreux-Varoguaux *et al.*, Lysergic acid amide-induced posterior reversible encephalopathy syndrome with status epilepticus, *Neurocrit. Care*, **9**, ID 247 (2008).
3. M. Meira, E. Pereira da Silva, J. P. David, J. P. David, Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **22**, 682-713 (2012).
4. N. Kaur, W. Cooper, J. M. Durringer *et al.*, Survival and development of potato psyllid (Hemiptera: Trioizidae) on Convolvulaceae: Effects of a plant-fungus symbiosis (*Periglandula*), *PLoS One*, **13**, e0201506 (2018).
5. M. Chary, D. Li, A. Manini, Candyflipping and other combinations: Identifying drug–drug combinations from an online forum, *Front Psychiatry*, **9**, 135 (2018).
6. I. Mercurio, P. Melai, D. Capano *et al.*, GC/MS analysis of morning glory seeds freely in commerce: can they be considered “herbal highs”? *Egypt J. For. Sci.*, **7**, ID 16 (2017).
7. A. Moubarak, E. Piper, Z. Johnson, M. Flieger, HPLC Method for detection of ergotamine, ergosine, and ergine after intravenous injection of a single dose, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 146-148 (1996).
8. J. Nowak, L. Wozniakiewicz, P. Klepacki *et al.*, Identification and determination of ergot alkaloids in Morning Glory cultivars, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 3093-3102 (2016).
9. R. Eker, S. Yilmaz, S. Yagmur, O. Yavintas, Voltammetric determination of clozapine from its drug form, *J. Sci. Persp.*, **1**, 19-30 (2017).
10. H. Aleixo, L. Okumura, A. Silva *et al.*, Adsorptive stripping voltammetric determination of oxolinic acid in water sample, *J. Braz. Chem. Soc.*, **29**, 1417-1430 (2018).
11. J. da Silva, J.R.F. da Silva, A. Pombeiro, Amavadin, a vanadium natural complex: Its role and applications, *Coordin. Chem. Rev.*, **257**, 2388-2400 (2013).
12. M.T. Domarus, *Studies of Amavadin and Related Complexes*, M.Sc. Thesis, Universidade do Lisboa, 2014.
13. I.I. Aksyonova, O.I. Panasenko, Ye. G. Knysh, Synthesis and physical-chemical properties of 3-(4-(tert-butyl)phenyl)-5-(R-ylthio)-4H-1,2,4-triazol-4-amines, *Act. Probl. Med. Pharm. Sci.*, **20**, 31-34 (2016).

14. V.M. Odyntsova, Ye. S. Pruglo, A.S. Gotsulya *et al.*, Antihypoxic activity of salts of (2-(5-(adamantane-1-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio) acetate acids, *Zapor. J. Med.*, **2**, 94-96 (2014).
15. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile - water mixtures, *Synth. Metals*, **130**, 45-55 (2002).
16. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *J. Phys. Chem.*, **114**, 12888-12893 (2010).
17. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synth. Metals*, **130**, 73-80 (2002).
18. V. Tkach, B. Kumara-Swamy, R. Ojani *et al.*, El mecanismo de la oxidación de omeprazol sobre el electrodo de carbono vitroso, modificado por polializarina, y su descripción matemática, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 1-5 (2017).
19. P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi, Utilisation of polypyrrole modified electrode for the determination of pesticide, *Int. J. Env. Anal. Chem.*, **85**, 409-422 (2005).
20. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira *et al.*, Electrochemical determination of Sudan dyes and two manner to realize it: a theoretical investigation, *Lett. Appl. NanoBioSci.*, **9**, 1451-1458 (2020).
21. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira *et al.*, The theoretical description for the electrochemical determination of anti-COVID-19 drug umifenovir, assisted by a poly(squaraine dye-co-naphthoquinones) composite with CoO(OH), paired with CoO<sub>2</sub>, *Lett. Appl. NanoBioSci.*, **10**, 1962-1968 (2021).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, V.V. Parchenko, V.M. Odyntsova, I.I. Aksyonova, Y.G. Ivanushko, P.I. Yagodynets', Z.O. Kormosh, A descrição matemática da detecção eletroquímica da ergina, assistida pelos novos derivados triazólicos, dopados pelo íon amavadina, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 174-184 (2021).



# Estudio descriptivo transversal de los grupos terapéuticos más prescritos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México

Veronica Castro Bear<sup>1</sup>, Francisco L. Balderas Gómez<sup>1</sup>, Oscar Zuñiga Lemus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BUAP, Complejo Regional Sur, Carretera Libramiento Tecnológico-San Marcos Necoxtla, Km 7 5, Lázaro Cárdenas Sur, 75859 Tehuacán, Puebla, México.

<sup>2</sup> Universidad de la Cañada, Carretera Teotitlán - San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n., Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México, C.P. 68540, 68540 Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México. Teléfono: 236 372 0712.

Autor de correspondencia: [oszulemus@hotmail.com](mailto:oszulemus@hotmail.com)

Recibido: 8 de septiembre de 2020

Revisado: 12 de noviembre

Aceptado: 16 de noviembre de 2020

## RESUMEN

**Objetivo:** conocer cuáles son los grupos terapéuticos más prescritos, las principales formas farmacéuticas usadas y el porcentaje de polifarmacia que presentan las recetas que son proporcionadas a los pacientes en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, tanto del sector salud como privado. **Metodología:** para lo cual se realizó un estudio de tipo cuantitativo observacional de tipo descriptivo transversal. **Resultados:** existe una correlación entre la edad y la forma farmacéutica prescrita, cabe decir que la forma farmacéutica más usada en las recetas corresponde a las tabletas. Así mismo, se puede evidenciar que las recetas que comúnmente reciben los pacientes presentan más de un principio activo, siendo los grupos terapéuticos más prescritos son los antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos y vitaminas.

*Palabras Clave:* Recetas, grupos terapéuticos, polifarmacia.

## SUMMARY

### A descriptive cross-sectional study of the most prescribed pharmacological groups in the municipality of Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, Mexico

**Aim:** to know the most prescribed pharmacological groups, the main pharmaceutical forms used, and the percentage of polypharmacy presented by the prescriptions that are provided to patients in the municipality of Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, both in the health sector as private. **Methodology:** for which a quantitative observational study of descriptive cross-sectional type was conducted. **Results:** there is a correlation between age and the pharmaceutical form prescribed, it can be said that the pharmaceutical form most used in oral recipes, tablets being the most common. Likewise, it can be evidenced that the prescriptions they require received the patients presented more than one active ingredient, the most prescribed pharmacological groups being non-steroidal anti-inflammatory drugs, antibiotics, and vitamins.

*Key words:* Recipes, therapeutics groups, polypharmacy.

## RESUMO

### Estudo transversal descritivo dos grupos terapêuticos mais prescritos no município de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México

**Objetivo:** saber quais são os grupos terapêuticos mais prescritos, as principais formas farmacêuticas utilizadas e a porcentagem de polifarmácia apresentada pelas prescrições que são fornecidas aos pacientes do município de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, tanto no setor saúde como no setor privado. **Metodologia:** para a qual foi realizado um estudo transversal observacional descritivo quantitativo. **Resultados:** há correlação entre a idade e a forma farmacêutica prescrita, cabe ressaltar que a forma farmacêutica mais utilizada nas prescrições corresponde aos comprimidos. Da mesma forma, pode-se comprovar que as prescrições que comumente os pacientes recebem possuem mais de um princípio ativo, sendo os grupos terapêuticos mais prescritos os antiinflamatórios não esteroidais, antibióticos e vitaminas.

*Palavras-chave:* Receitas, grupos terapêuticos, polifarmácia.

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (PAHO), para 2018 México contaba con una población de 130 759 millones de habitantes, con una esperanza de vida de 77,5 años y una tasa de mortalidad en menores de 5 años de 2,7% para enfermedades diarreicas agudas (EDA) y 5,5% para infecciones respiratorias agudas (IRA). La tasa de mortalidad por enfermedades específicas indica que para diabetes mellitus es de 95,8/100 000 habitantes y enfermedades cerebrovasculares es de 30,0/100 000 habitantes [1].

De este total de habitantes y de acuerdo a la última encuesta del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (Inegi), de 2015 en México, reveló que el 82,2% de la población está afiliada a un servicio de salud, mientras que un 17,2% no se encuentra afiliada, del porcentaje que tienen alguna afiliación un 49,9% es derechohabiente del seguro popular, el 39,2% es derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), un 7,7% acude al Instituto de Seguridad Social de Trabajadores de la Educación (ISSSTE) y solo el 1,1% a Petróleos Mexicanos (Pemex), Secretaría de la Defensa Nacional (SDN) o Secretaría de Marina (SM), cabe señalar que un 23,1% de la población recurre a médicos privados para ser atendidos [2]. Debido a la demanda en el seguro popular, se considera que aquellos afiliados a este servicio, así como los que no cuentan con afiliación alguna, no recibirán una atención médica de calidad lo que incluye en el no recibir medicamentos de manera adecuada [3].

En este sentido, el acceso a los medicamentos representa un reto para todos los sistemas de salud, sobre todo en los países en desarrollo, más aún la obtención de productos nuevos. Unas de las razones principales de este problema es el costo de los medicamentos, dificultad de los procesos regulatorios para la importación, las prioridades comerciales de la innovación, o bien el rechazo en algunos de los estudios por parte de la FDA o EMA entre otros [4-6]. Es por ello y con la finalidad de atender estos problemas la Secretaría de Salud en 2007 implementó una serie de procedimientos para obtener mejores precios, garantizar la información sobre la adquisición, perfeccionar la prescripción de recetas, entre otras [6, 7]. Sin embargo, esto no ha sido posible en México ya que no se ha dado la cobertura universal en el abasto de medicamentos [3].

Por otro lado, en aquellos pacientes que reciben atención médica se presentan diversos problemas en una prescripción inapropiada como son, el abuso de algunos grupos de medicamentos como los que se encuentran los antibióticos y otros medicamentos para el tratamiento de los problemas de salud con la finalidad de tratar infecciones respiratorias agudas y las enfermedades diarreicas, lo que ha generado resistencia antimicrobiana ya sea por la mala prescripción o por el mal seguimiento del tratamiento por los

pacientes [8-10]. Otra consecuencia es el eventual riesgo para la población usuaria de presentar interacciones medicamentosas (RAM), aunadas al incremento de los costos de la atención médica debido a una segunda prescripción de medicamentos [8, 11].

Finalmente, dentro de los problemas existentes con una inadecuada prescripción tenemos la denominada polifarmacia. Existen numerosas definiciones encontradas en la literatura para describir este término, pero en general ha sido definida como “el uso de múltiples medicamentos por un paciente”, aunque el número mínimo de medicamentos para poder hablar de polifarmacia no es preciso y ha cambiado con el tiempo, esta variación respecto al tiempo es debida al creciente incremento en el consumo de medicamentos, inicialmente, se consideró como el consumo simultáneo de dos hasta diez medicamentos [12-15]. Sin embargo, de acuerdo con la guía práctica clínica *Prescripción farmacológica razonada para el adulto mayor* publicada en el 2012 por el Consejo de Salubridad General del Gobierno de México, esta no ha sufrido modificaciones hasta la fecha y define a la polifarmacia como al uso de cuatro o más medicamentos [16]. En cualquiera de los casos descritos esto aumenta el costo de tratamiento por persona [8,11].

Según lo anterior y considerando que el uso de más de un medicamento puede ser un factor de riesgo para pacientes, el objetivo de este estudio fue conocer cuáles son los grupos terapéuticos más prescritos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca. Y conocer las principales formas farmacéuticas usadas y el porcentaje de polifarmacia que presentan las recetas que son proporcionadas a los pacientes, ya que hasta el momento la parte de polifarmacia ha sido estudiada de manera general y se ha enfocado únicamente a los adultos mayores [17], lo anterior podría ayudar a establecer las bases de una reducción en el abuso de ciertos grupos de medicamentos, reducir la polifarmacia y (en el futuro) evaluar la presencia de interacciones farmacológicas que no se reportan y que no hacen parte de este trabajo.

## METODOLOGÍA

### Aspectos éticos

Para proteger la información personal de cada individuo que participó en este estudio, los datos fueron protegidos de acuerdo con *la Ley federal de protección de datos personales en posesión de los particulares* vigente en los Estados Unidos Mexicanos. También se tuvo en cuenta el principio de “libertad de elección”, así, después de haber sido informados sobre la finalidad del trabajo, los pacientes tuvieron la posibilidad de otorgar o no el consentimiento para que los datos proporcionados fueran analizados [18, 19].

## Recolección de datos

La recolección de los datos se hizo a través de un elemento secundario, para este estudio la investigación se realizó de manera cuantitativa observacional de tipo transversal descriptivo [20]. Para conocer los principales grupos de fármacos prescritos entre la población en general de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, se hizo una campaña de recolección de recetas entre la población, sin tener una sede en especial, las recetas fueron recolectadas con ayuda de estudiantes de séptimo semestre de Ingeniería en Farmacobiología de la Universidad de la Cañada, la cual está ubicada en el municipio del estudio, la recolección se llevó a cabo entre agosto y octubre del 2019 (3 meses) y fue coordinada por los autores de este trabajo. En esta recolección no considero si las recetas fueron otorgadas en el sector privado o en el sector salud. Por ello, se hizo un muestreo probabilístico aleatorio simple.

## Cálculo de tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue calculado considerando un nivel de confianza del 0,95 con un error de 0,05 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N \times Z_a^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_a^2 \times p \times q}$$

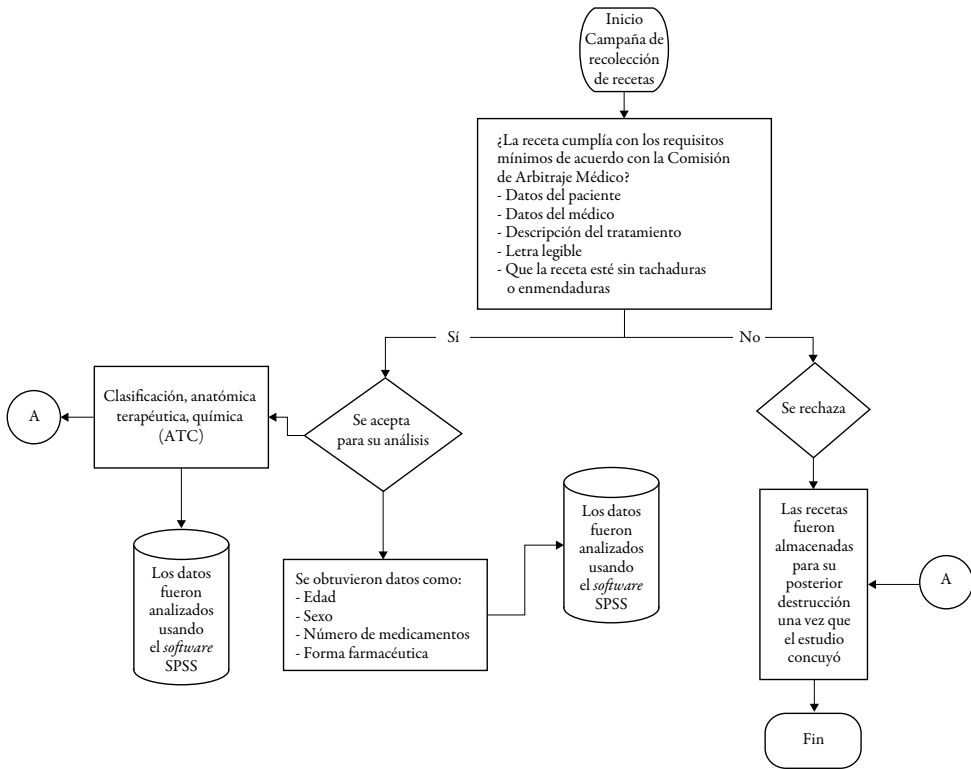
En donde,  $N$  = tamaño de la población,  $Z$  = nivel de confianza,  $p$  = probabilidad de éxito o proporción esperada,  $q$  = probabilidad de fracaso y  $d$  = precisión (error máximo admisible en términos de proporción).

## Criterios de inclusión y exclusión

Para considerar las recetas para su análisis únicamente se consideró como criterio de exclusión la ilegibilidad de la letra o si presentaban tachaduras o enmendaduras. De 370 recetas obtenidas se descartaron 69 debido a que no cumplían con los requeridos mínimos para su análisis de acuerdo con los criterios de inclusión (figura 1). El principal criterio de exclusión fue la legibilidad en la letra, otro criterio fue que la descripción del tratamiento no cumplía con los elementos básicos de una receta médica de acuerdo a lo establecido en la Comisión Nacional de Arbitraje Médico [21].

## Clasificación de los medicamentos

Los medicamentos obtenidos fueron clasificados en base al código del sistema de clasificación anatómica, terapéutica, química (ATC) del portal del Centro Colaborador de la OMS en Metodología Estadística sobre Medicamentos [22, 23] y para contabilizar



**Figura 1.** Diagrama de flujo criterios de inclusión y exclusión de las recetas.

el porcentaje de polifarmacia se usó como criterio la “prescripción farmacológica razonada para el adulto mayor” [16].

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó estadística descriptiva, para el análisis inferencial se utilizaron tablas de contingencia con  $\chi^2$  de Pearson usando el paquete estadístico SPSS (versión 19.0). Con este mismo paquete se obtuvieron frecuencias, medias, desviaciones y porcentajes, analizando cada una de las variables farmacológicas en estudio, como lo fue: vía de administración, grupo farmacológico, forma farmacéutica, las cuales se manejaron como variables politómicas. Y las variables intrínsecas: edad, peso y sexo fueron consideradas como nominales cualitativas categóricas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El municipio de Teotitlán de flores Magón cuenta con 14 localidades, incluida la cabecera con el mismo nombre Teotitlán de Flores Magón, de las cuales la localidad con mayor cantidad de población es esta última con 7598 habitantes y los 1368 habitantes resaltantes están distribuidos en las otras 13 localidades que forman este municipio, todas ellas comprenden zonas conocidas como no urbanas. La población de este municipio se distribuye de acuerdo con sus rangos de edades: población de 0 a 14 años 2765 habitantes (30,8%), de 15 a 64 años 5502 (61,3%) y de 65 años y más 699 habitantes (7,7%). A excepción de la cabecera, la cual presenta un grado de marginación media, todas las localidades se encuentran con un grado de marginación alto debido a ello, el porcentaje de derechohabientes en el seguro popular es de 77,9%, hay 11,5% y 12,6% afiliados al IMSS o ISSSTE respectivamente [24-26].

De acuerdo con los datos de la Secretaría de Desarrollo Social (Sedesol) la principal causa de muerte es accidentes y la segunda, es la diabetes sin especificar si se trata de diabetes *Mellitus* tipo I o II (tabla 1)

**Tabla 1.** Distribución porcentual de casos registrados por principales causas de muerte. Unidad de microrregiones, cédulas de información municipal [25].

Causas de muerte	Porcentaje
Causas externas de mortalidad*	33,3
Diabetes	30,0
Enfermedades del sistema genitourinario	3,3
Enfermedades hipertensivas	3,3
Enfermedades infecciosas y parasitarias	10,0
Tumores	20,0

\* Accidentes de tráfico de vehículos de motor; otros accidentes de transporte; ahogamiento; sumersión y sofocación accidentales; envenenamiento; suicidio, etc.

Para determinar si existía una relación entre la edad y la forma farmacéutica recetada se realizó una prueba de Chi-cuadrado de Pearson, que dio un valor de significancia menor a 0,05 (tabla 2), este dato fue corroborado mediante un análisis de V de Cramer cuya significancia fue menor a 0,05 (tabla 3), lo que nos permite asegurar que hay una relación entre la forma farmacéutica y la edad.

**Tabla 2.** Pruebas de Chi-cuadrado edad *vs.* forma farmacéutica.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	569 501 <sup>a</sup>	492	0,009
Razón de verosimilitudes	300 454	492	1,000
Asociación lineal por lineal	8591	1	0,003
N.º de casos válidos	275		

<sup>a</sup> 533 casillas (97,6%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. El valor de  $p < 0,05$  en este caso es 0,009 por lo tanto hay relación entre edad y forma farmacéutica.

**Tabla 3.** Medidas simétricas edad *vs.* forma farmacéutica.

		Valor	Sig. aproximada
Nominal por nominal	Phi	1,439	0,009
	V de Cramer	0,415	0,009
N.º de casos válidos		275	

También se usó el mismo análisis para conocer si existía relación entre la edad y el grupo farmacológico (tabla 4).

**Tabla 4.** Relación entre la edad y el grupo farmacológico.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1519 229 <sup>a</sup>	1148	0,000
Razón de verosimilitudes	642 252	1148	1,000
Asociación lineal por lineal	1,619	1	0,203
N.º de casos válidos	275		

<sup>a</sup> 1217 casillas (99,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 0,00. El valor de  $p < 0,05$  en este caso es 0,000 por lo tanto no hay relación entre edad y grupo farmacológico.

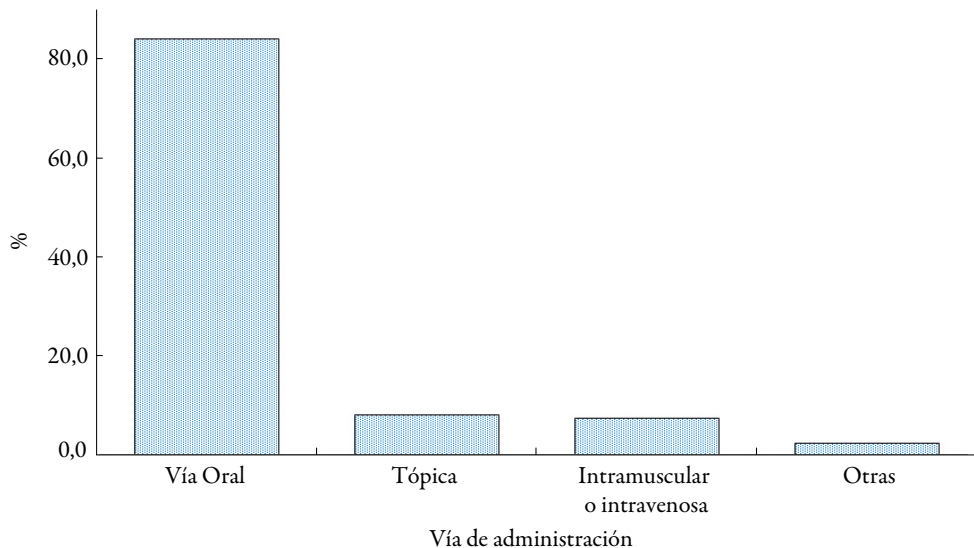
La tabla 5 muestra que de las 120 recetas analizadas el 65,8% corresponde al sexo femenino y el 34,2% al masculino.



**Tabla 5.** Distribución de frecuencia según el sexo del paciente.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Femenino	181	60,1	65,8
Masculino	94	31,2	34,2
Total	275	91,4	100,0
Sistema	26	8,6	
Total	301	100	

La figura 2 muestra que la vía de administración más recetada fue la vía oral con un 84,0%, seguida por la vía tópica con un 8%.



**Figura 2.** Porcentaje de la vía de administración más usada.

Del 84% obtenido de la vía de administración es posible apreciar que la forma farmacéutica más utilizada son las tabletas y cápsulas con un 57,8% y 9,6%, respectivamente, y en tercer lugar tenemos a los inyectables con 6,6% (tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de formas farmacéuticas.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Tabletas	174	57,8
	Cápsulas	29	9,6
	Inyectables	20	6,6
	Gel	5	1,7
	Grageas	4	1,3
	Tabletas efervescentes	2	0,7
	Suspensión	6	2,0
	Crema	5	1,7
	Polvo	6	2,0
	Jarabe	16	5,3
	Gotas oftálmicas	6	2,0
	Ungüento	1	0,3
	Tabletas masticables	1	0,3
	Total	275	91,4
Perdidos	Sistema	26	8,6
Total		301	100

Por otro lado, la tabla 7 muestra la media de edad, peso, número de medicamentos que fueron prescritos por receta respecto al rango. También muestra la media de las recetas obtenidas en rangos de edad de 10 años y es posible apreciar una distribución gaussiana en la frecuencia de recetas respecto al rango de edad, podemos apreciar que la media de principios activos que contenían las recetas en general es igual o mayor a dos principios por receta.

En la tabla 8 es posible apreciar que el 75% de las recetas que se proporcionaron a los pacientes contenía más de un principio activo, los que contenían de 2 a 3 principios activos eran las recetas con mayor porcentaje con un 29,2 y 32,5%, respectivamente, para un total de 61,7% solo entre ellas, lo cual se relaciona con un estudio previo en el que se observa que el 66% de las recetas estudiadas presenta de 1 a 3 fármacos prescritos [27]. Del total de recetas obtenidas, el 13,4% presentaron polifarmacia, aunque es

**Tabla 7.** Valor de media de peso, media de medicamentos recetado por receta, frecuencia de recetas, media de recetas, respecto al rango de edad.

Rango de edad	Media edad $\pm$ SD (años)	Media peso $\pm$ SD (Kg)	Media del número de medicamentos recetados por receta $\pm$ SD	Frecuencia de recetas respecto al rango de edad (n=121)	Media de recetas respecto al rango de edad $\pm$ SD
1-10 años	5,4	23,8	2,6	10	8,2
11-20 años	17,5	55,2	2,6	17	13,9
21-30 años	24,5	62,8	2,1	44	36,1
31-40 años	36,5	66,5	2,0	11	9,0
40-50 años	45,5	67,8	2,8	26	21,3
50-60 años	57,4	71,9	1,6	5	4,1
60 o más	72,1	65,3	2,6	9	7,4

importante señalar que del total de recetas analizadas solo el 1,7% presentaron polifarmacia con pacientes menores a 10 años o adultos mayores a 50 años.

En la tabla 9 se pueden identificar los grupos terapéuticos más prescritos, de ellos los AINEs representaron el 18,3% del total de principios activos prescritos, seguido de antibióticos y vitamínicos con un 15,0 y 9,3%, respectivamente. Los inhibidores de la bomba de protones en conjunto con inhibidores del receptor H2, los cuales fueron agrupados en un solo conjunto y representaron el 5,3%, en todos los casos los resultados presentados en el presente trabajo no muestran si los medicamentos fueron prescritos al mismo tiempo o bien si eran del mismo paciente ya que no se buscó en si la presencia de RAMs.

**Tabla 8.** Porcentaje de principios activos encontrados por receta.

Número de principios activos por receta	Frecuencia n=120	%	Media edad $\pm$ Des. Est
1	30	25,0	32,1 $\pm$ 18,45
2	35	29,2	26,13 $\pm$ 16,91
3	39	32,5	34,54 $\pm$ 16,6
4	8	6,7	30,12 $\pm$ 10,80
5	5	4,2	35,6 $\pm$ 15,69
6	2	1,7	9 $\pm$ 11,3
7	0	0,0	0,0 $\pm$ 0,0
8	1	0,8	80,00 $\pm$ 0,0

**Tabla 9.** Grupos farmacológicos más prescritos.

Grupo farmacológico	Frecuencia	%
Antiinflamatorio no esteroideo	55	18,3
Antibiótico	45	15
Vitamínico	28	9,3
Inhibidores en el transporte o liberación de protones	16	5,3
Antihistamínicos	15	5
Antihipertensivos	14	4,7
Antiparasitario	13	4,3
Antiespasmódico	9	3
Mucolítico	9	3
Regulador de la motilidad	8	2,7
Antiinflamatorio esteroideo	7	2,3
Antiemético	7	2,3
Antidiabéticos	6	2
Espasmódicos	5	1,7
Anestésico/analgésico	5	1,7
Antihipercolesterolemico	4	1,3
Vasoprotector/antivaricoso	4	1,3
Antitusígeno	3	1
Antivertiginoso/antiemético	3	1
Electrolitos	3	1
Antidepresivos	3	1
Dolor neuropático	2	0,7
Bactericida	2	0,7
Lubricante oftálmico	2	0,7
Antimicótico	2	0,7
Antiulceroso	1	0,3
Antiepiléptico	1	0,3
Descongestionante/analgésico tópico	1	0,3
Esteatohepatitis no alcohólica	1	0,3
Antipsicótico	1	0,3

La tabla 10 muestra el porcentaje de AINES, antibióticos, vitaminas y antiparasitarios más prescritos. En el caso de los AINES el paracetamol es el de mayor frecuencia con 35,2%, seguido del diclofenaco el cual se receta solo o combinado y representa el 14,8%, en tercer lugar, se encuentra el ibuprofeno solo o combinado junto con el naproxeno ambos con un 9,3% del total de medicamentos prescritos.

**Tabla 10.** Porcentaje de Aines, antibióticos, y vitaminas más prescritos.

Antiinflamatorios no esteroideos (Aines)	Frecuencia n=54	%	Antibióticos	Frecuencia n=55	%	Vitaminas	Frecuencia n=28	%
Paracetamol solo o combinado	19	35,2	Amoxicilina o combinada	11	20	Complejo B y combinado	12	42,9
Diclofenaco sódico solo o combinado	8	14,8						
Ibuprofeno solo o combinado	5	9,3	Ampicilina	5	9,1	Ácido ascórbico	4	14,3
Naproxeno	5	9,3	Trimetoprima	5	9,1	Ácido fólico	4	14,3
Ketorolaco	4	7,4	Sulfametoxazol					
Nimesulida	4	7,4	Ciprofloxacino	4	7,3	Multivitamínico	3	10,7
Piroxicam	3	5,6	Clindamicina	3	5,5	Vitamina D	2	7,1
Metamizol solo o combinado	2	3,7	Amikacina	2	3,6	Hierro	2	7,1
Acetofenaco	1	1,9	Bencilpenicilina	2	3,6	Calcio	1	3,6
Varidasa	1	1,9	Ceftriaxona	2	3,6			
Meloxicam solo o combinado	1	1,9	Claritromicina	2	3,6			
Ácido acetil salicílico	1	1,9	Penicilina	2	3,6			

En el caso de los antibióticos los principios activos más prescritos correspondieron a la amoxicilina ya sea sola o combinada con un 20%, seguido de ampicilina, trimetoprima con sulfametoxazol con 9,1%, ciprofloxacino con 7,3% y clindamicina con 5,5%. Es importante mencionar que el grupo de los  $\beta$ -lactámicos es el grupo más usado con un 39,9% del total de antibióticos prescritos, seguido de los inhibidores en la síntesis de ácido fólico con 9,1% (tabla 10). El tercer grupo farmacológico más relevante fueron las vitaminas, en la clasificación de este grupo se incluyeron las hidrosolubles, liposolubles, así como los grupos ATC hierro y calcio con la finalidad de no hacer más extensa la clasificación, dentro de ellos el complejo B en sus diferentes formas farmacéuticas, fue el que presenta un mayor porcentaje de apariciones con 42,9%, seguido del ácido ascórbico y ácido fólico con 14,3% en ambos casos (tabla 10).

En el caso de los antiparasitarios, el más recetado fue el metronidazol seguido del albendazol dando un 56,2% del total de antiparasitarios prescritos.

De manera general encontramos que de un total de 275 principios activos prescritos el más común es el paracetamol con 6,9%, seguido del complejo B con 4,3% y la amoxicilina sola o combinada con 4,0% (tabla 11).

De acuerdo con reportes de la Secretaría de Economía, los medicamentos OTC, en 2012 reportaron ventas por 1,840 mdd. Los antibióticos de la tercera clase son los medicamentos más vendidos a nivel mundial, con un total de ventas anuales que oscilan entre \$7 000 000 y \$22 000 000 000 millones de dólares. De los cuales se sugiere que alrededor de \$5000 millones son resultado del pago extra que generan las bacterias resistentes a los antibióticos [28, 29]. Estos reportes concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo ya que son estos grupos los principales que se recetan en el municipio de Teotitlán de Flores Magón.

En el caso de los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que se venden y se consume a nivel mundial [4]. Los reportes que muestran el impacto económico o ambiental del uso inapropiado de los antibióticos fueron: una prescripción inadecuada de antibióticos representó el 63% del gasto anual de un hospital, así mismo se ha sugerido que la prescripción inadecuada representa un costo adicional por paciente de 3,57 dólares para infecciones respiratorias agudas (IRAs) y 8,37 dólares para enfermedades diarreicas agudas (EDAs) [30], en otro estudio en México se concluyó que la mayor parte (38%) de las reacciones adversas a medicamentos reportadas en una institución de salud se debieron a medicamentos antiinfecciosos particularmente antibióticos [31]. Es de importante resaltar que, en el 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó una campaña a nivel mundial destinada a proteger los antibióticos para las futuras generaciones. Haciendo un llamado a los Gobiernos, los profesionales de la

**Tabla 11.** Porcentaje de principios activos más prescritos.

Medicamento	Frecuencia n=275	%
Paracetamol solo o combinado	19	6,9
Complejo B solo o combinado	12	4,3
Amoxicilina o combinada	11	4,0
Ambroxol o combinado	10	3,6
Clorfenamina	8	2,9
Diclofenaco sódico	8	2,9
Butilioscina	7	2,5
Metoclopramida	7	2,5
Metronidazol	6	2,2
Omeprazol	6	2,2
Trimetoprima con sulfametoxazol	5	1,8
Ambroxol	5	1,8
Naproxeno	5	1,8
Ampicilina	5	1,8

salud, la industria, la sociedad civil y los pacientes para actuar de manera coordinada a fin de mitigar la propagación de la resistencia bacteriana, preservando de esta forma los adelantos médicos para las generaciones futuras [29].

Si estos resultados los relacionamos con los reportes previos que indican que una vez que las personas se sienten mejor les queda medicamento los guardan en sus hogares para auto medicarse posteriormente [20], o bien los desechan a la basura municipal generando un gasto en salud importante [32] esto nos lleva a pensar que los sistemas de salud deben modificar las conductas al momento de recetar los medicamentos.

Por otro lado, los medicamentos que más se prescriben son los antibióticos, AINEs y antihipertensivos, lo cual concuerda con resultados previos en los que evidenciamos que son este grupo de medicamentos que más se desechan al concluir su vida útil [33] y que necesariamente son los que generan un gasto en salud [4]. De acuerdo con el Colegio Estadounidense de Reumatología, los antiinflamatorios no esteroideos son unos de los medicamentos más utilizados para aliviar el dolor en los adultos ya que la mayoría de las personas pueden tomar AINEs, lo cual concuerda con nuestros resulta-

dos en donde el grupo de fármacos más recetado es este grupo de medicamento, aunque en este trabajo no se clasificó de acuerdo con la edad y el medicamento prescrito. Así mismo, podemos apreciar que el paracetamol es el principio activo con mayor frecuencia en las recetas y concuerda con los datos del Colegio Estadounidense de Reumatología como uno de los medicamentos con mayor prescripción para el dolor [34].

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que no existe una correlación entre la edad y el grupo farmacológico recetado, sin embargo, si hay una relación entre la edad y la forma farmacéutica lo cual puede esperarse debido a que en edad pediátrica la forma farmacéutica más usada son jarabes y suspensiones y en la edad adulta son las tabletas, cápsulas, grageas, etc. Cabe decir que la vía de administración más reportada en las recetas es la oral, siendo las tabletas la forma farmacéutica más común. Así mismo, se puede evidenciar que las recetas que comúnmente reciben los pacientes presentan más de un principio activo, aunque solo un 13,4% del total de ellas presenta polifarmacia de acuerdo con el Consejo de Salubridad General del Gobierno de México, el cual indica que con más de cinco principios activos recetados es considerado como polifarmacia.

De los grupos de medicamentos más prescritos están los antiinflamatorios no esteroideos, de ellos el paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno son los más comunes, en segundo lugar, se encuentran los antibióticos siendo los beta-lactámicos como: amoxicilina, ampicilina los más prescritos, seguidos por los inhibidores del ácido fólico. En tercer lugar, se encuentran las vitaminas, encontrando al complejo B como el más frecuente.

Estos datos se correlacionan con reportes previos en donde demostramos que los medicamentos más desechados por la población de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, en general son antibióticos, AINEs e antihipertensivos [34], es por ello la importancia de reducir la cantidad de medicamentos prescritos debido a que ello contribuye al desecho de manera incorrecta por parte de la población de este municipio. Además, esto puede contribuir a la presencia de reacciones adversas medicamentosas (RAMs) aunque esto no está evidenciado en el presente trabajo ya que no fue la finalidad del mismo demostrar la presencia de estas interacciones.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés.



## REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud, OMS, *Indicadores básicos Situaciones de Salud de las Américas*, 2018, URL: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49511/IndicadoresBasicos2018\\_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49511/IndicadoresBasicos2018_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y), accesado 9 de septiembre de 2019.
2. INEGI, Salud y seguridad social, 2015, URL: [https://www.inegi.org.mx/temas/derechohabiencia/default.html#Informacion\\_general](https://www.inegi.org.mx/temas/derechohabiencia/default.html#Informacion_general), accesado 20 de octubre de 2019.
3. J.C. Alcocer-Varela, Secretaría de Salud, *Proyecto Plan Nacional de Salud*, 2019, URL: [http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/Plan\\_Nacional\\_Salud\\_2019\\_2024.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/Plan_Nacional_Salud_2019_2024.pdf), accesado 10 de noviembre de 2019.
4. IMS Institute for Healthcare Informatics, *The Global Use of Medicines: Outlook Through*, 2016, URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20306en/s20306en.pdf>, accesado 9 de octubre de 2019.
5. D. Henry, J. Lexchin, The pharmaceutical industry as a medicine provider, *Lancet*, **360**(9345), 1590-1595 (2002).
6. N. Gasman, Políticas farmacéuticas en México: que 20 años no es nada, *Salud Publ. Méx.*, **50**(4), S423-S426 (2008).
7. R. Molina-Salazar, E. González-Marín, C. Carbajal de Nova, Competencia y precios en el mercado farmacéutico mexicano, *Salud. Publ. Mex.*, **50**(4), S496-S503 (2008).
8. H.F. Mota, Abuso de antimicrobianos y otros conceptos erróneos en el tratamiento de diarreas en niños, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, **44**(10), 577-579 (1987).
9. G. Gutiérrez, G.C. Martínez, H. Guizcafré, C.G. Gómez, A. Peniche, H.O. Muñoz, Encuesta sobre el uso de antimicrobianos en las infecciones respiratorias agudas en la población rural mexicana, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, **43**(12), 761-768 (1986).
10. J. Calva, Antibiotic use in a periurban community in Mexico: A household and drugstore survey, *Soc. Sci. Med.*, **42**(8), 1121-1128 (1996).

11. L.G. Miller, A. Blum, Physician awareness of prescription drug costs: A missing element of drug advertising and promotion, *J. Fam. Pract.*, **36**(1), 33-36 (1993).
12. B. Hovstadius, K. Hovstadius, B. Åstrand, G. Petersson, Increasing polypharmacy-an individual-based study of the Swedish population 2005-2008, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **10**(1), Article 16 (2010).
13. T. Linjakumpu, S. Hartikainen, T. Klaukka, J. Veijola, S.L. Kivelä, R. Isoaho, Use of medications and polypharmacy are increasing among the elderly, *J. Clin. Epidemiol.*, **55**(8), 809-817 (2002).
14. L. Bjerrum, J.U. Rosholm, J. Hallas, J. Kragstrup, Methods for estimating the occurrence of polypharmacy by means of a prescription database, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **53**(1), 7-11 (1997).
15. J. Jyrkkä, H. Enlund, M.J. Korhonen, R. Sulkava, S. Hartikainen, Polypharmacy status as an indicator of mortality in an elderly population, *Drugs Aging*, **26**(12), 1039-1048 (2009).
16. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), IMSS-558-12, *Prescripción Farmacológica Razonada para el Adulto Mayor*, Guía de referencia rápida, 2012, URL: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/558GRR.pdf>, accesado 18 de diciembre de 2019.
17. T.M. Jorgensen, Prescription drug use among ambulatory elderly in Swedish Municipality, *Ann. Pharmacother.*, **27**(9), 1120-1125 (2008).
18. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión, *Ley Federal de protección de Datos personales en posesión de los particulares*, URL: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFPDPPP.pdf>, accesado 30 de enero de 2019.
19. Conbioética, Secretaría de salud, *Cometimiento informado*, URL: [http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/interior/temasgeneral/consentimiento\\_informado.html](http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/interior/temasgeneral/consentimiento_informado.html), accesado 30 de enero de 2019.
20. O. Zuñiga-Lemus, F.L. Balderas-Gómez, V. Castro-Bear, Destino final de los medicamentos caducos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, *Salud Adm.*, **4**(12), 15-23 (2017).
21. Comisión Nacional de Arbitraje médico, Gobierno de México, *Elementos básicos de una receta médica*, URL: <https://www.gob.mx/conamed/es/articulos/elementos-basicos-de-una-receta-medica?idiom=es>, accesado 18 de octubre 2020.

22. M.V. Salandrigas, El sistema de clasificación ATC de sustancias farmacéuticas para uso humana, *Panace*, **5**(15), 58-60 (2004).
23. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology WHOCC, 2018-02-15, Structure and principles, URL: [https://www.whooc.no/atc/structure\\_and\\_principles/](https://www.whooc.no/atc/structure_and_principles/), accesado 10 de mayo de 2019.
24. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, *Áreas geográficas*, URL: <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?ag=20545>, accesado 25 de octubre de 2020.
25. Cédula de Información municipal (SCIM), Municipios: Nacional, SEDESOL, Secretaría de desarrollo social, *Unidad de microrregiones*, URL: <http://www.microrregiones.gob.mx/zap/poblacion.aspx?entra=nacion&ent=20&mun=545>, accesado 25 de octubre de 2020.
26. Sistema de Apoyo para la planeación del PDZP, SEDESOL, Secretaría de desarrollo social, Catálogo de Localidades, URL: <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/LocdeMun.aspx?tipo=clave&campo=loc&ent=20&mun=545>, accesado 28 de octubre de 2020.
27. A.C. Alvarado, G.X. Ossa, M.L. Bustos, Errores en las recetas médicas y en la preparación de estas en farmacia de pacientes ambulatorios: El caso del Hospital de Nueva Imperial, *Rev. Méd. Chile*, **145**(1), 33-40 (2017).
28. V.C. Lee, The antibiotic resistance crisis, *Pharm. Ther.*, **40**(4), 277-283 (2015).
29. Organización Panamericana de la Salud, La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas, 2011, URL: [https://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1450:la-resistencia-a-los-antimicrobianos-un-factor-de-riesgo-para-las-enfermedades-infecciosas&Itemid=500](https://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=1450:la-resistencia-a-los-antimicrobianos-un-factor-de-riesgo-para-las-enfermedades-infecciosas&Itemid=500), accesado 28 de agosto de 2019.
30. W. Flores, H. Ochoa, J. Briggs, R. Garcia, A. Kroeger, Economic costs associated with inadequate drug prescribing: an exploratory study in Chiapas, Mexico, *Acta Trop.*, **88**, 57-68 (2003).
31. D. Hernández-Santillán, L. Rodríguez-Betancourt, L. Vasso-Gutiérrez, Farmacovigilancia IV: La experiencia institucional, *Rev. Med. IMSS*, **43**, 257-266 (2005).
32. M.A. Bautista-Castro, E. Betanzos-Ibáñez, A.J. Ruiz-Padilla, V. Castro-Bear, F.L. Balderas-Gómez, O. Zuñiga-Lemus, Estudio farmacoeconómico de medica-

- mentos colectados en la comunidad de Teotitlán de Flores Magón Oaxaca, *Rev. OFIL*, **27**(3), 285-288 (2017).
33. O. Zuñiga-Lemus, J.S. González-González, M.C. Hernández-Galindo, V. Vera-Pineda, A. Miranda-López, Recolecta y clasificación de medicamentos caducados en la comunidad de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México durante 36 meses, *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **47**(3), 86-93 (2016).
34. American College of Rheumatology, URL: <https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Tratamientos/AINEs>, Actualizado Marzo, 2019, accesado 1 de enero de 2020.

### COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

V. Castro-Bear, F.L. Balderas Gómez, O. Zuñiga Lemus, Estudio descriptivo transversal de los grupos terapéuticos más prescritos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 185-204 (2021).

## Descripción matemática de la determinación electroanalítica del fármaco salvarsano y su ciclooligómeros, asistida por un compuesto del colorante escuárico y oxihidróxido de cobalto

Volodymyr V. Tkach<sup>1,2</sup>, Marta V. Kushnir<sup>1</sup>, Yana G. Ivanushko<sup>3</sup>, Sílvio C. de Oliveira<sup>2</sup>, Lucinda Vaz dos Reis<sup>4</sup>, Petro I. Yagodynets<sup>1</sup>, Zholt O. Kormosh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Chernivtsi, 58000, Calle de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrania.

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

<sup>3</sup> Universidad Estatal de Medicina de Bucovina, 58000, Plaza Teatral. 9, Chernivtsi, Ucrania.

<sup>4</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Folhadela, Vila Real, Portugal.

<sup>5</sup> Universidad Nacional del Este Europeo, 43000, Av. de Libertad, 13, Lutsk, Ucrania.

\*Autor para correspondencia: [nightwatcher2401@gmail.com](mailto:nightwatcher2401@gmail.com)

Recibido: 21 de noviembre de 2019

Revisado: 15 de noviembre de 2020

Aceptado: 19 de noviembre de 2020

### RESUMEN

**Objetivo:** en este trabajo se realiza, por primera vez, la evaluación teórica de la posibilidad de la detección electroanalítica de salvarsano, fármaco antisifilítico. El oxihidróxido de cobalto, en su compuesto con el colorante escuárico, se usa como modificador de electrodo. **Metodología:** mediante el análisis de estabilidad, se ha confirmado su eficiencia en los procesos de detección de salvarsano. La linealidad de dependencia entre el parámetro electroquímico y la concentración del fármaco se obtiene y se mantiene fácilmente. **Conclusión:** las inestabilidades oscilatoria y monótona se realizan en el sistema, causadas por las influencias de las etapas electroquímicas a las capacitancias de la doble capa eléctrica (DCE).

*Palabras clave:* Salvarsano, sensor electroquímico, oxihidróxido de cobalto, colorante escuárico, oscilaciones electroquímicas, estado estacionario estable.

## SUMMARY

The mathematical description of the electroanalytical determination of salvarsan drug and its cyclooligomers, assisted by the composite of squaraine dye with cobalt oxyhydroxide

**Aim:** In this work, the theoretical evaluation of the electroanalytical detection of antisyphilitic drug salvarsan is given for the first time. Cobalt oxyhydroxide in a composite with the squaraine dye is used as electrode modifier. **Methodology:** By means of the stability analysis the efficiency of the salvarsan determination is confirmed. The linearity of the dependence between the electrochemical parameter and drug concentration is easily obtained and maintained. **Conclusion:** The oscillatory and monotonic instabilities are realized in this system, being caused by the electrochemical stages' influences to the double electric layer (DEL).

*Keywords:* Salvarsan, electrochemical sensor, cobalt oxyhydroxide, squaraine dye, electrochemical oscillations, stable steady-state.

## RESUMO

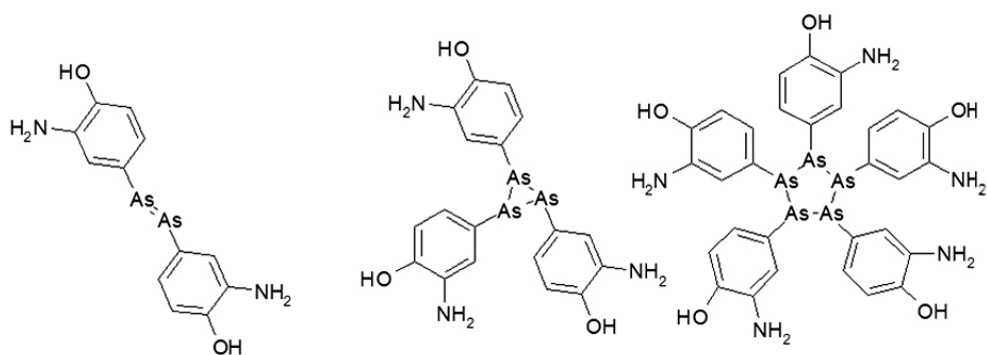
A descrição matemática da determinação eletroanalítica do fármaco salvarsan e seus ciclo-oligômeros, auxiliada pela composição do corante esquaraína com oxihidróxido de cobalto

**Objetivo:** neste trabalho, a avaliação teórica da detecção eletroanalítica do antissifilítico salvarsan é feita pela primeira vez. O oxihidróxido de cobalto em um composto com o corante esquaraína é usado como modificador de eletrodo. **Metodologia:** por meio da análise de estabilidade é confirmada a eficiência da determinação de salvarsan. A linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico e a concentração do fármaco é facilmente obtida e mantida. **Conclusão:** as instabilidades oscilatórias e monotônicas são percebidas neste sistema, sendo causadas pelas influências dos estágios eletroquímicos sobre a dupla camada elétrica (DEL).

*Palavras-chave:* Salvarsan, sensor eletroquímico, oxihidróxido de cobalto, corante esquaraína, oscilações eletroquímicas, estado estacionário estável.

## INTRODUCCIÓN

Arsfenamina, 3-3'-diamino-4-4'-dihidroxiarsenobenceno (figura 1, a la izquierda) (CAS: 139-93-5,  $M = 368$  g/mol comercializada como Salvarsano y hasta como “compuesto 606”, es uno de los fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de sífilis [1-5], siendo uno de los primeros desarrollados y usados para tratar esta enfermedad. Estudios recientes han mostrado que la arsfenamina suele entrar en la reacción de ciclooligomerización, formando un trímero y un pentámero (figura 1, al centro y a la derecha).



**Figura 1.** El salvarsano y sus formas oligoméricas.

El compuesto fue desarrollado en 1910. Dos años más tarde apareció su derivado neo-salvarsano, más soluble en el agua y fácil de preparar. Ambos compuestos han sido usados no solo en el tratamiento de sífilis, sino en la cura de tripanosomiasis [5, 6]. Sin embargo, a pesar de su eficacia, el salvarsano y derivados no se pueden usar en grandes cantidades, por presencia de arsénico, cuyos compuestos son famosos por su toxicidad [7-10]. Además, hay dificultades en almacenar el salvarsano y derivados por su facilidad de oxidar (se usa la atmosfera de nitrógeno o gases nobles). Por eso el uso de salvarsano disminuyó en 1940 con el descubrimiento de penicilina. Hoy en día, el salvarsano solo se usa en algunos países de América Latina, de África subsahariana y de Asia. Por eso, el desarrollo de un método de su detección cualitativa y cuantitativa permanece actual [11-14].

Por ahora, no hay métodos electroquímicos de la detección de salvarsano. Sin embargo, los otros compuestos de arsénico han sido detectados electroquímicamente [15, 16]. Para tal, se han usado varios modificadores, incluyendo el oxihidróxido de cobalto [17-20], que es un semiconductor del tipo *p*, visto por investigadores como alternativa al dióxido de titanio.

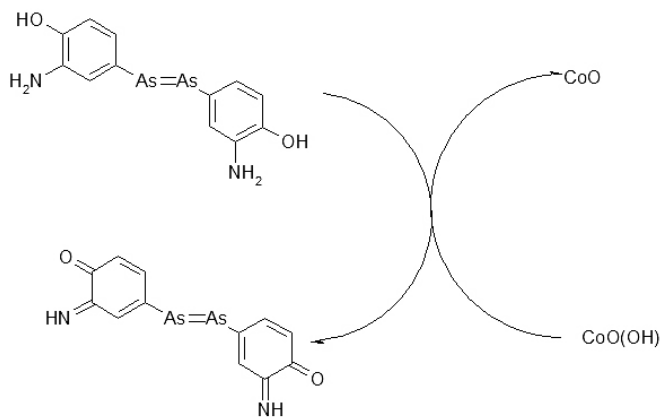
Sin embargo, el uso de nuevos procesos electroanalíticos, antes de implementarlo debe ser analizado teóricamente. Esto resolvería problemas como:

- La indecisión acerca del mecanismo más probable de las etapas químicas y electroquímicas, que llevan a la aparición de la señal electroanalítica.
- La indecisión acerca de la secuencia y orden de reacciones, con las que se da el proceso electroanalítico.
- La posibilidad de realización de inestabilidades oscilatoria y monotónica, características para sistemas análogos [21-26].

Para resolver los tres problemas mencionados es importante llevar a cabo una investigación teórica *a priori* del comportamiento del sistema electroanalítico. Así, en este trabajo se investiga desde punto de vista matemático la posibilidad de determinación electroquímica del salvarsano en la presencia del oxihidróxido de cobalto, depositado sobre un colorante escuárico. Por el desarrollo del modelo y su análisis se verifican los requisitos de estabilidad de estado estacionario, como las condiciones de las inestabilidades oscilatoria y monotónica. Además, mediante el análisis teórico se compara (con exactitud y sin ensayos experimentales adicionales) el comportamiento de este sistema con los semejantes [27, 28].

## EL SISTEMA Y SU MODELO

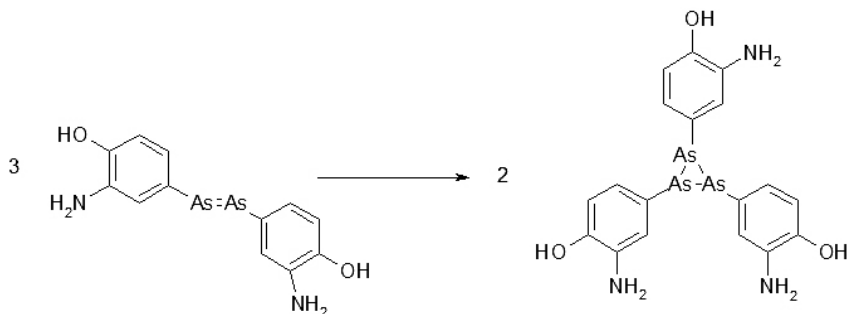
Como la molécula de salvarsano contiene un exceso de electrones se oxida fácilmente. El oxihidróxido de cobalto podrá participar de su oxidación de diferentes maneras. En el caso de la oxidación del *o*-aminofenol se formará el CoO:



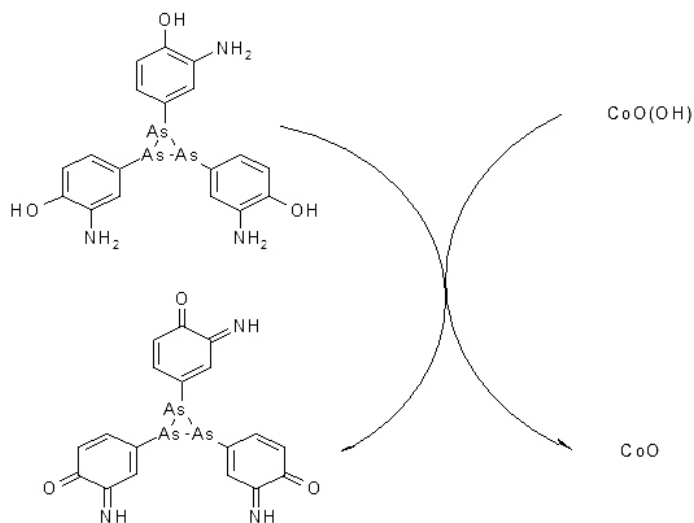
**Figura 2.** Oxidación de salvarsano por el 2-aminofenol.



El trímero cíclico, que se forma según la reacción (figura 3) se oxida por el oxihidróxido de cobalto con una facilidad aún mayor (figura 4).



**Figura 3.** Ciclotrimerización del fragmento del salvarsano.



**Figura 4.** Oxidación de ciclitrímero sobre el oxihidróxido de cobalto.

Así, el comportamiento en el sistema se describirá por un conjunto de ecuaciones diferenciales de tres variables:

$s$ : la concentración del salvarsano en la capa presuperficial.

$s^*$ : la concentración del ciclitrímero (sesquímero) de salvarsano en la capa presuperficial.

$c$ : el grado de recubrimiento de la superficie de electrodo por el óxido de cobalto.

Para simplificar el modelo, suponemos que el reactor se agita intensamente, lo que permite ignorar el flujo de convección. Además, suponemos que el electrolito de soporte está presente en su exceso, dejándonos menospreciar el flujo de migración. Suponemos, también, que el perfil concentracional de las sustancias en la capa presuperficial es lineal, y su espesor, constante e igual a  $\delta$ .

Se puede verificar que el comportamiento del sistema se describe por el conjunto de ecuaciones diferenciales (1):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{ds}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{S}{\delta} (s_0 - s) - r_S - r_{O1} \right) \\ \frac{ds^*}{dt} = \frac{2}{\delta} (r_S - r_{O2}) \\ \frac{dc}{dt} = \frac{1}{C} (r_{O1} + r_{O2} - r_2) \end{array} \right. \quad (1)$$

Siendo  $S$  el coeficiente de difusión del salvarsano,  $s_0$  su concentración en el interior de la solución,  $C$  es la concentración superficial máxima del óxido de cobalto,  $r_S$  es la velocidad de la sesquimerización (trimerización cíclica) y  $r_{O1}$ ,  $r_{O2}$  y  $r_2$  son velocidades de oxidaciones químicas y electroquímica. Las velocidades de reacciones respectivas se pueden calcular conforme:

$$r_S = k_S s^3 \quad (2)$$

$$r_{O1} = k_{O1} s (1 - c)^4 \quad (3)$$

$$r_{O2} = k_{O2} s^* (1 - c)^6 \quad (4)$$

$$r_2 = k_{O1} c \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (5)$$

En donde los parámetros  $k$  son constantes de velocidad de las respectivas reacciones,  $F$  es el número de Faraday,  $\varphi_0$  es el salto de potencial en la doble capa eléctrica (DCE), relacionado al potencial de carga cero,  $R$  es la constante universal de gases y  $T$  es la temperatura absoluta.

En general, el comportamiento de este proceso se hace semejante al observado en estudios previos [27, 28]. Sin embargo, la presencia de dos formas de una sustancia impactará el comportamiento del sistema, conforme se describirá en el siguiente apartado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar el comportamiento del sistema con la detección electroanalítica del salvarsano, analizamos el conjunto de ecuaciones diferenciales (1) mediante la teoría de la estabilidad lineal. Los elementos estacionarios de la matriz Jacobiana se describen como:

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

Siendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left( -\frac{S}{\delta} - k_{O1}s(1-c)^4 - 3k_s s^2 \right) \quad (7)$$

$$a_{12} = 0 \quad (8)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} \left( 4k_{O1}s(1-c)^3 \right) \quad (9)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} \left( 3k_s s^2 \right) \quad (10)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} \left( -k_{O2}(1-c)^6 \right) \quad (11)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} \left( 6k_{O2}s^*(1-c)^5 \right) \quad (12)$$

$$a_{31} = \frac{1}{C} \left( k_{O1}s(1-c)^4 \right) \quad (13)$$

$$a_{32} = \frac{1}{C} \left( k_{O2}(1-c)^6 \right) \quad (14)$$

$$a_{33} = \frac{1}{C} \left( -4k_{O1}s(1-c)^3 - 6k_{O2}s^*(1-c)^5 - k_{O1}c \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) - jk_{O1}c \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \right) \quad (15)$$

Analizando las expresiones (7), (11) y (15), podemos averiguar que la *inestabilidad oscilatoria* en este sistema se puede realizar. Para que la bifurcación de Hopf, correspondiente a la inestabilidad oscilatoria, se lleve a cabo es necesario que haya elementos positivos en la diagonal principal de la matriz. El único elemento, que puede ser positivo, es  $-jk_{O1}c \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) > 0$ , si  $j < 0$ . Así como en estudios previos [27, 28], esta positividad solo se obtiene con las influencias fuertes de la reacción electroquímica a la capacitancia de la DCE, que llevaran a cambios periódicos de la capacitancia y de la conductividad de la capa. Las oscilaciones son frecuentes y de poca amplitud.

Para investigar la *estabilidad de estado estacionario* de este sistema, aplicamos al conjunto de ecuaciones diferenciales (2) el criterio Routh-Hurwitz. Simplificando el análisis de la matriz, introducimos nuevas variables, de modo que se describa su determinante conforme:

$$\frac{4}{\delta^2 C} \begin{vmatrix} -\sigma - \Sigma - s & 0 & \varphi \\ \Sigma & -\lambda & \Phi \\ s & \lambda & -\varphi - \Phi - \Omega \end{vmatrix} \quad (16)$$

Abriendo los paréntesis y aplicando el requisito  $\text{Det } J < 0$ , se obtendrá, después de reagrupados los elementos, la condición de estabilidad conforme (17):

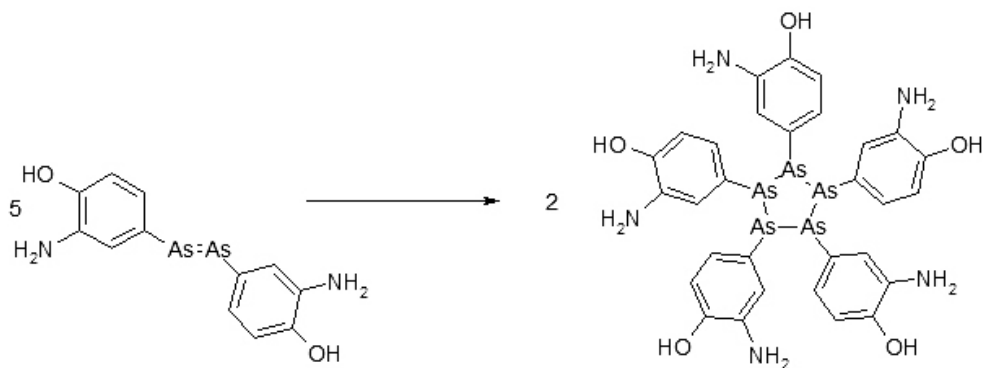
$$-\sigma (\lambda\varphi + \lambda\Omega) - \lambda\varphi (\Sigma + s) < 0 \quad (17)$$

Que solo puede **no** realizarse si  $\Omega < 0$ , por causa de las influencias en la DCE ya descritas. Como la realización de esas influencias se da en condiciones bastante específicas, se puede afirmar que se trata de un sistema electroanalítico eficiente, que se controla tanto por la difusión como por las reacciones. Como no hay reacciones laterales capaces de comprometer la estabilidad y eficiencia del proceso electroanalítico, la estabilidad de estado estacionario describe la dependencia lineal entre el parámetro electroquímico y la concentración de fármaco.

Cuando el estado estacionario está en vigor, el determinante tiene valores negativos. Cuando el determinante se anula, se obtiene el límite de detección, descrito por la *inestabilidad monotónica*. Su punto sirve de margen entre estados estacionarios estables e inestables y, para el caso, se describe como:

$$-\sigma (\lambda\varphi + \lambda\Omega) - \lambda\varphi (\Sigma + s) < 0 \quad (18)$$

La ciclooligomerización del salvarsano también se puede dar con la formación de un pentágono (figura 5).



**Figura 5.** Ciclooligomerización del salvarsano.

Así, el modelo (2) se rectifica, incluyendo la formación del pentámero cíclico, alterándose las expresiones  $r_s$  y  $r_{O_2}$ . Por lo demás, el comportamiento del sistema será el mismo.

## CONCLUSIONES

A partir del análisis teórico de la detección electroquímica de salvarsano sobre el oxihidróxido de cobalto, en la presencia de ciclooligómeros, se concluye que:

- Pese que el mecanismo de la detección del analito sea híbrido, se trata de un sistema electroanalítico eficiente de un complejo estable.
- El proceso electroanalítico se controla de igual manera por la difusión o por la reacción.
- El comportamiento oscilatorio en este sistema es posible, porque la etapa electroquímica puede influir en la capacitancia, la conductividad y la fuerza iónica de la doble capa eléctrica.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. L. Zaffiri, J. Gardner, L. Toledo-Pereyra, History of antibiotics. From Salvarsan to cephalosporins, *J. Invest. Surg.*, **25**, 67-77 (2012).
2. A. Gelpi, A. Gilbertson, J. Tucker, Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology, *Sex. Transm. Inf.*, **91**, 68-69 (2015).
3. H.F. Lewis, A review of the American patent literature on arsphenamine (Salvarsan) and other arsenicals, *Ind. Eng. Chem.*, **11**, 141-145 (1919).
4. P. Valent, B. Groner, U. Schumacher *et al.*, Paul Ehrlich (1854-1915) and his contributions to the foundation and birth of translational medicine, *J. Innate Immun.*, **8**, 111-120 (2016).
5. N.C. Lloyd, H.W. Morgan, B.K. Nicholson, R.S. Ronimus, The composition of Ehrlich's Salvarsan: resolution of a century-old debate, *Angew. Chem. Int.*, **44**, 941-945 (2005).
6. K.J. Williams, The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine – the first magic bullet, *J. R. Soc. Med.*, **102**, 343-348 (2009).
7. D. Steverding, The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review, *Parasit. Vectors*, **3**, Article 15 (2010).
8. G.E. Ebright, Toxic effects of Salvarsan, *Cal. State J. Med.*, **11**, 492-494 (1913).
9. J.O. Hirschfelder, The use of Salvarsan, *JAMA*, **57**, 1667-1670 (1917).
10. K.A. Sepkowitz, One Hundred Years of Salvarsan, *New Engl. J. Med.*, **365**, 291-293 (2011).
11. D.E. Keil, J. Berger-Ritchie, G.A. McMillin, Testing for toxic elements: A focus on arsenic, cadmium, lead, and mercury, *Lab. Med.*, **42**, 735-742 (2011).
12. Y. Su, G. Liu, Y. Cai, Thiolated arsenicals in arsenic metabolism: Occurrence, formation, and biological implications, *J. Environ. Sci. (China)*, **49**, 59-73 (2016).
13. Ch. Fan, G. Liu, Y. Long *et al.*, Thiolation in arsenic metabolism: a chemical perspective, *Metallomics*, **10**, 1368-1382 (2018).

14. D. Oliveira-Guimarães, L. da Silva-Momesso, M.T. Pupo, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Quím. Nova*, **33**, 667-669 (2010).
15. A. Cheng, R. Tyne Y.T. Kwok *et al.*, Investigating arsenic contents in surface and drinking water by voltammetry and the method of standard additions, *J. Chem. Educ.*, **93**(11), 1945-1950 (2016).
16. A. Salimi, H. Mamkherzi, R. Hallaj, S. Soltanian, Electrochemical detection of trace amount of arsenic(III) at glassy carbon electrode modified with cobalt oxide nanoparticles, *Sens. Act. B. Chem.*, **129**, 246-254 (2008).
17. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaissi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 122-126 (2015).
18. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E. Guimarães Castro *et al.*, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 318-322 (2015).
19. O. Stadnik, *Electrochemical and Photoelectrochemical Properties of the Oxide-hydroxide Compounds of Cobalt*, Diss. Kand. Chim. N. – Kyiv, 2011.
20. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting. Abstract #2240.
21. S.U. Rahman, M.S. Ba-Shammakh, Thermal effects on the process of electropolymerization of pyrrole on mild steel, *Synth. Metals*, **140**, 207-223 (2004).
22. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798-1803 (2008).
23. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen., Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene) films, *Russ. J. Electrochem.*, **40**, 280-285 (2004).
24. D. Sazou, The dynamic behavior of the electrochemical polymerization of indole in acetonitrile - water mixtures, *Synth. Metals*, **130**, 45-55 (2002).
25. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *J. Phys. Chem.*, **114**, 12888-12893 (2010).

26. M. Bazzaoui, E.A. Bazzaoui, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc–lead–silver alloys electrodes in acidic and neutral organic media, *Synth. Metals*, **130**, 73-83 (2002).
27. V.V. Tkach, Ya.G. Ivanushko, S.M. Lukanova *et al.*, The theoretical evaluation for the possibility of the pyriproxyfen CoO(OH)-assisted electrochemical detection in water, *Appl. J. Envir. Eng. Sci.*, **3**, 90-95 (2017).
28. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira *et al.*, Theoretical evaluation for the function of economical and green conducting composite material-based chip for Jamaican vomiting sickness diagnostics, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **11**, 10317-10324 (2021).

### COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, Y.G. Ivanushko, S.C. de Oliveira, L. Vaz dos Reis, P.I. Yagodynets', Z.O. Kormosh, Descripción matemática de la determinación electroanalítica del fármaco salvarsano y su ciclooligómeros, asistida por un compuesto del colorante escuárico y oxihidróxido de cobalto, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 205-216 (2021).



# Hydrazones derived from natural aldehydes: *in vitro* cytotoxic evaluation and *in silico* pharmacokinetic predictions

Victória Laysna dos Anjos Santos<sup>1</sup>, Arlan de Assis Gonsalves<sup>1</sup>, Maria Franciele Souza Silva<sup>2</sup>, Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira<sup>2</sup>, Marcília Pinheiro da Costa<sup>3</sup>, Claudia O. Pessoa<sup>2</sup>, Cleônia Roberta Melo Araújo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate of Health and Biological Sciences Program, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

<sup>2</sup> Postgraduate of Physiology and Pharmacology Program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>3</sup> Graduate of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

\*Corresponding author: cleonia.araujo@univasf.edu.br

Received: 29 October 2020

Revised: 16 November 2020

Accepted: 19 November 2020

## SUMMARY

**Introduction:** Recent research has reported the cytotoxic potential of hydrazones against various strains of cancer cells. **Aim:** To evaluate the anticancer activity *in vitro* and the pharmacokinetic profile of six synthesized hydrazone compounds, identified as vanillin 1-phthalazinyldiazone (VAN-1); 2,4-dinitrophenylhydrazone vanillin (VAN-2); phenylhydrazone cinnamaldehyde (CIN-1); isonicotinoyl hydrazone cinnamaldehyde (CIN-2); cinnamaldehyde 1-phthalazinyldiazone (CIN-3); and 2,4-dinitrophenylhydrazone cinnamaldehyde (CIN-4). The cytotoxic activity was evaluated against four strains of cancer cells. **Methodology:** The pharmacokinetic parameters of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADME/T) of the hydrazones were evaluated using the PreADMET program. **Results:** Hydrazones derived from cinnamaldehyde (CIN-1 and CIN-2) showed high cytotoxic activity against leukemic (HL-60) and glioblastomas (SF-295) cell lines. The pharmacokinetic profile of the hydrazones showed that, in general, the hydrazones presented satisfactory characteristics of ADME/T. In addition, it was observed that CIN-2 presented the most promising *in silico* profile,

showing high intestinal absorption, desirable distribution profile related to plasma protein binding, adequate renal excretion, and low toxicity. The ADME/T profile of the CIN-1 compound highlighted its potential as a promising antineoplastic agent with action of the CNS, more specifically against glioblastomas.

*Keywords:* Antineoplastic drugs, cancer, molecular hybridization, phenylhydrazones.

## RESUMEN

### Hidrazonas derivadas de aldehídos naturales: evaluación citotóxica *in vitro* y determinación del perfil farmacocinético *in silico*

**Introducción:** Investigaciones recientes han informado del potencial citotóxico de las hidrazonas contra varias líneas de células cancerosas. **Objetivo:** Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* y el perfil farmacocinético de seis compuestos hidrazónicos sintetizados, identificados como vainillina 1-ftalazinilhidrazona (VAN-1); vainillina 2,4-dinitrofenilhidrazona (VAN-2); fenilhidrazona cinamaldehído (CIN-1); cinamaldehído de isonicotinoil hidrazona (CIN-2); cinamaldehído 1-ftalazinilhidrazona (CIN-3); y 2,4-dinitrofenilhidrazona cinamaldehído (CIN-4). Se evaluó la actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares cancerosas. **Metodología:** Los parámetros farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/T) de las hidrazonas se evaluaron mediante el programa PreADMET. **Resultados:** Las hidrazonas derivadas del cinamaldehído (CIN-1 y CIN-2) mostraron una alta actividad citotóxica contra las líneas celulares leucémicas (HL-60) y glioblastomas (SF-295). El perfil farmacocinético de las hidrazonas mostró que, en general, las hidrazonas mostraban características satisfactorias de ADME/T. Además, se observó que CIN-2 presentó el perfil *in silico* más prometedor, presentando alta absorción intestinal, perfil de distribución deseable relacionado con la unión a proteínas plasmáticas, excreción renal adecuada y baja toxicidad. El perfil ADME/T del compuesto CIN-1 destacó su potencial como agente antineoplásico prometedor con acción sobre el SNC, más específicamente contra los glioblastomas.

*Palabras clave:* Fármacos antineoplásicos, cáncer, hibridación molecular, fenilhidrazonas.

## RESUMO

Hidrazonas derivadas de aldeídos naturais: avaliação citotóxica *in vitro* e determinação de perfil farmacocinético *in silico*

**Introdução:** Pesquisas recentes relataram o potencial citotóxico das hidrazonas contra várias linhagens de células cancerígenas. **Objetivo:** Validar a atividade anticâncer *in vitro* e o perfil farmacocinético de seis compostos hidrazônicos sintetizados, identificados como vanilina 1-ftalazinil-hidrazona (VAN-1); vanilina 2,4-dinitrofenil-hidrazona (VAN-2); cinnamaldeído de fenil-hidrazona (CIN-1); cinnamaldeído isonicotinoil-hidrazona (CIN-2); 1-ftalazinil-hidrazona de cinnamaldeído (CIN-3); e cinnamaldeído de 2,4-dinitrofenil-hidrazona (CIN-4). A atividade citotóxica foi avaliada contra quatro linhagens de células cancerígenas. **Metodologia:** Os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/T) das hidrazonas foram avaliados utilizando o programa PreADMET. **Resultados:** As hidrazonas derivadas do cinnamaldeído (CIN-1 e CIN-2) apresentaram alta atividade citotóxica contra as linhagens celulares leucêmicas (HL-60) e de glioblastomas (SF-295). O perfil farmacocinético das hidrazonas mostrou que, em geral, as hidrazonas apresentaram características satisfatórias de ADME/T. Além disso, observou-se que a CIN-2 apresentou o perfil *in silico* mais promissor, exibindo alta absorção intestinal, perfil de distribuição desejável relacionado à ligação às proteínas plasmáticas, excreção renal adequada e baixa toxicidade. O perfil ADME/T do composto CIN-1 destacou seu potencial como um agente antineoplásico promissor com ação do SNC, mais especificamente contra glioblastomas.

*Palavras-chave:* Medicamentos antineoplásicos, câncer, hibridação molecular, fenil hidrazonas.

## INTRODUCTION

Cancer is a complex disease that involves the interruption of proliferation control, resistance to cell death, invasion, and metastasis [1]. Among the main resources used in cancer treatment are surgical removal, hormone therapy, radiotherapy and chemotherapy. Such resources are often used in conjunction [2].

Falzone *et al.* [3] reported the evolutionary importance of chemotherapy in cancer, and significantly improved the survival and quality of life of patients. However, the main problems related to the use of antineoplastic agents in cancer treatment are still the high toxicity, low selectivity, and resistance of these drugs [3, 4]. In addition, the

pharmacokinetic characteristics of antineoplastics are also limiting factors in the effectiveness of treatment, as they can trigger some problem related to absorption, distribution, metabolism and/or excretion of chemotherapy. These obstacles are responsible for serious side effects related to cancer therapy, because the risks related to the use of these drugs are generally superior to their benefits [5].

In the search for more effective and safer antineoplastic drugs, hydrazones are being widely studied for use in the pharmacotherapy of neoplasias, because they have the ability to inhibit the *in vitro* growth of several neoplastic cell lines, including breast, human colon, lung, esophagus, pancreas, and leukemia cancers [6]. Hydrazones have in their chemical structure the function azomethine (R-CH=N-NH) [7] and can be examples of molecular hybrids, since they are obtained through condensation reactions between biologically active aldehydes and hydrazines [8].

Cheminformatics is a useful tool in the development of new drugs with bioactivity and/or with desired pharmacokinetic properties [9]. Among the main applications of cheminformatics in this field, the use of computational methods to filter and select potentially active compounds based on their molecular characteristics, as well as the determination of the pharmacokinetic characteristics of these compounds, stand out [10]. The use of computational tools is advantageous for the development of pharmaceuticals, since *in silico* screenings promote time savings, as well as financial resources [11].

In this sense a series of six hydrazones was planned by means of synthesized molecular hybridization, and their potential as new anti-cancer agents were evaluated through *in vitro* cytotoxicity assays against four tumor cell lines, and by *in silico* tests to determine the pharmacokinetic profile of the hydrazone compounds under study.

## MATERIAL AND METHODS

The hydrazones were planned and synthesized for evaluation of their antineoplastic capacities, through the evaluation of *in vitro* cytotoxicity against tumor cell lines. Then, to verify the potentiality of their use as drugs, the pharmacokinetic profile was evaluated by *in silico* tests of the series of synthesized hydrazones.

### Synthesis of phenylhydrazones

The hydrazones were obtained through the methodology described by Souza *et al.* [12], from the reaction between vanillin and cinnamaldehyde with hydrazines. The six hydrazones obtained were named: vanillin 1-phthalazinyldiazone (VAN-1), vanillin 2,4-dinitrophenylhydrazone (VAN-2), cinnamaldehyde phenylhydrazone (CIN-1),

cinnamaldehyde isonicotinohydrazone (CIN-2), cinnamaldehyde 1-phthalazinylhydrazone (CIN-3), and cinnamaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone (CIN-4).

### **In vitro cytotoxicity testing: MTT method**

The cells were plated at concentrations of  $0.7 \times 10^5$ ,  $0.1 \times 10^6$ ,  $0.3 \times 10^6$  cells/mL for the HCT-116 (human colon cancer cells), HL-60 (human leukemia cells), PC-3 (human prostate cancer cells) and SF-295 (glioblastoma cells), respectively. The plates were incubated with the substance for 72 h in a greenhouse at 5.0% CO<sub>2</sub> at 37 °C. At the end, they were centrifuged and the supernatant was removed. Then, 150 mL of MTT solution (tetrazolium salt) was added, and the plates were incubated again for three h. After this period, the plates were again centrifuged to remove the MTT solution. The absorbance was read after dissolution of the formazan precipitate with 150 mL of pure DMSO in a plate spectrophotometer at 595 nm. The single concentration experiments were analyzed according to the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the percentage of cell growth inhibition (GI %) using an OriginLab® program. To evaluate the cytotoxic potential of the samples tested, it was used the scale described by Souza *et al.* [13], where the hydrazones were classified as: i) no activity: GI%  $\leq$  0.00%; ii) low activity: GI% from 1.00% to 50.00%; iii) moderate activity: GI% from 50.00% to 75.00%; and iv) high activity: GI% greater than 75.00%.

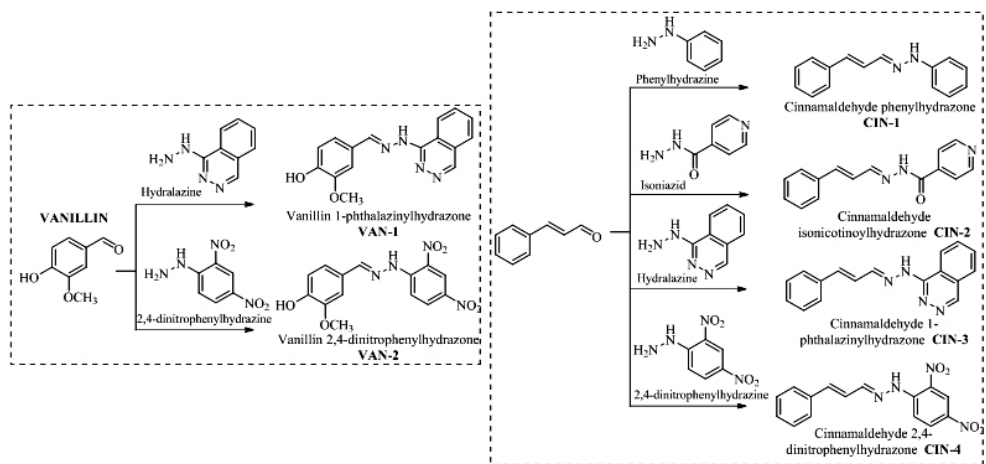
### **ADME/T profile of the hydrazone derivatives**

For evaluation of the pharmacokinetic and toxicological profile (ADME/T) *in silico*, the program PreADMET, available online and for free at <http://preadmet.bmdrc.org/>, was used. The structures of the six hydrazones were designed and analyzed in the modules of prediction of ADME and toxicity. For evaluation of each parameter, the following descriptors were chosen: absorption- absorption in Caco-2 cells and human intestinal absorption (HIA); Distribution-binding to plasma protein levels (PPL) and permeability in the Blood-Brain Barrier (BBB); Metabolism-interaction with enzymes from the CYP complex; Excretion-renal excretion through permeability in MDCK cells; and Toxicity - mutagenicity, carcinogenicity in rats and cardiotoxicity by inhibition of the hERG gene. The reference values used for each parameter are described in table 1, along with the results obtained.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

A series composed of six hydrazones was planned by molecular hybridization using the natural aldehydes vanillin (VAN-1 and VAN-2) and cinnamaldehyde (CIN-1 - CIN-4), which are synthesized as described by Souza *et al.* (2020) [12] (figure 1). With the

precursor vanillin, two hydrazones called VAN-1 and VAN-2, with yields of 98.0% and 70.0%, respectively, were obtained. For the cinnamaldehyde precursor, four hydrazonic derivatives were obtained, with high yields, denominated CIN-1 (91.0%), CIN-2 (84.0%), CIN-3 (X.X%), and CIN-4 (60.0%) (figure 1).

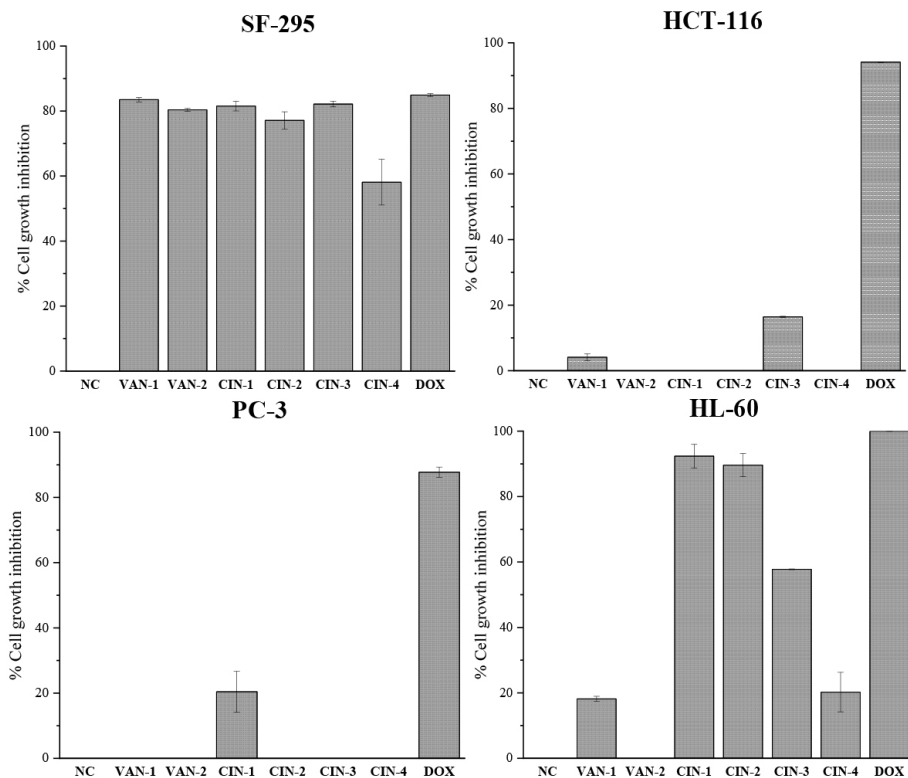


**Figure 1.** Chemical structure of hybrid hydrazones synthesized and evaluated *in vitro* and *in silico*.

### In vitro cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity of the respective hydrazonic derivatives (VAN-1, VAN-2, CIN-1, CIN-2, CIN-3, and CIN-4) were evaluated against four HCT-116, HL-60, PC-3 and SF-295 tumor cell lines in 72 h of the treatment. The compounds were tested at the following concentrations: 34.0; 30.1; 45.0; 39.8; 36.5 and 32.0  $\mu\text{M}$ , respectively for VAN-1, VAN-2, CIN-1, CIN-2, CIN-3 and CIN-4. And was obtaining the percentage of growth inhibition (GI%) shown for each strain, as described in figure 2.

In the analysis of the results, it was observed that in front of the lineage of human colon cancerous cells (HCT-16) and prostate cancerous cells (PC-3), the tested hydrazones presented none or low cytotoxic activity (GI < 50%). In HCT-116 cells, only two derivatives presented low capacity to inhibit the growth of this cellular type, VAN-1 and CIN-3, with GI equal to  $4.10 \pm 1.04\%$  and  $16.44 \pm 0.17\%$ , respectively. In the specific case of these derivatives, they were obtained as a product of molecular hybridization between vanillin or cinnamaldehyde with hydralazine (figure 1), the latter a drug used in the treatment of severe hypertension, heart failure and gestational hypertension [14].

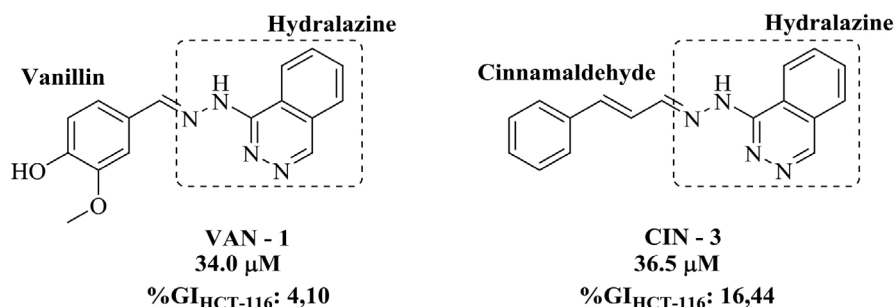


**Figure 2.** Cell growth inhibition percentage (%GI) of the compounds VAN-1, VAN-2, CIN-1, CIN-2, CIN-3 and CIN-4 in four tumour cell lines. Negative control (NC). Doxorubicin (DOX). Results are means  $\pm$  SD.

Hydralazine is a hydrazine that, in addition to its highlighted antihypertensive properties, has already shown promising antineoplastic activity against several types of cancer, such as prostate [14], leukemia [15] and cervical cancer [16]. The main mechanism of action of hydralazine in the treatment of neoplasms consists of a weak inhibition of the methylation of the DNA that is hyper-methylated during the carcinogenic process, resulting in the reactivation and expression of tumor suppressor genes [17].

Considering the antineoplastic activity already presented by hydralazine, as well as the fact that only the hydrazone derivatives containing it in its structure presented cytotoxicity against human colon cancer cells (HCT-116), it is possible to attribute this activity to the molecular hybridization between the phthalazinyl nucleus of hydralazine and the natural aldehydes employed, resulting in phenylhydrazones VAN-1 and CIN-3 (figure 3). Moreover, it was also found that the CIN-3 compound showed

greater inhibition capacity than VAN-1, demonstrating the positive influence of the portion originating from cinnamaldehyde, with the carbon spacing between the hydrazone function and its second aromatic ring, as well as the fact that the second ring is not replaced, resulting in a hydrazone approximately four times more active compared to HCT-116 cells.



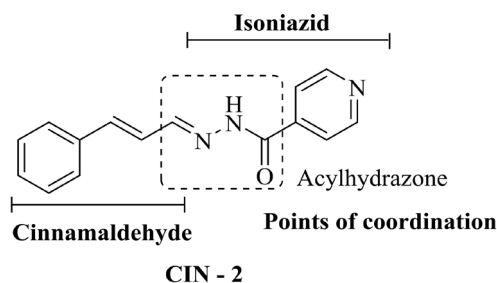
**Figure 3.** Structural comparison of the hydralazine derivatives (VAN-1 and CIN-3).

In leukemic cells (HL-60) it was observed that only the compound VAN-2 did not present cytotoxic activity, and the derivatives of cinnamaldehyde CIN-1 and CIN-2 are the most active hybrids in front of this cellular lineage, with GI of  $92.37 \pm 3.60\%$  and  $89.62 \pm 3.54\%$ , respectively. CIN-2 hydrazone is the only acylhydrazone in the tested series, and was obtained through molecular hybridization between cinnamaldehyde and isoniazid, and the latter is a drug used clinically in the treatment of tuberculosis [18].

The isoniazid-derived acylhydrazones present significant antitumor activity described in the literature, and this bioactive profile is mainly attributed to the chelating capacity of metals that these compounds exhibit [19]. Since neoplastic cells use iron as an essential growth factor for their proliferation [19], one of the strategies in antineoplastic pharmacotherapy is to reduce the concentration of this metal through the use of chelating substances and thus hinder the development and spread of cancer [20, 21]. The acylhydrazones derived from isoniazid, such as the compound CIN-2, present in its structure points of coordination with metals, resulting from the acylhydrazone function present in its structure that, as seen, can be related to its antineoplastic activity in relation to leukemic cells (figure 4).

As for the cytotoxic activity against prostate cancerous cells (PC-3), only CIN-1 hydrazone exhibited capacity to inhibit cell growth, with GI of  $20.43 \pm 6.31\%$ , and was classified as a compound of low cytotoxic activity in relation to the scale used.





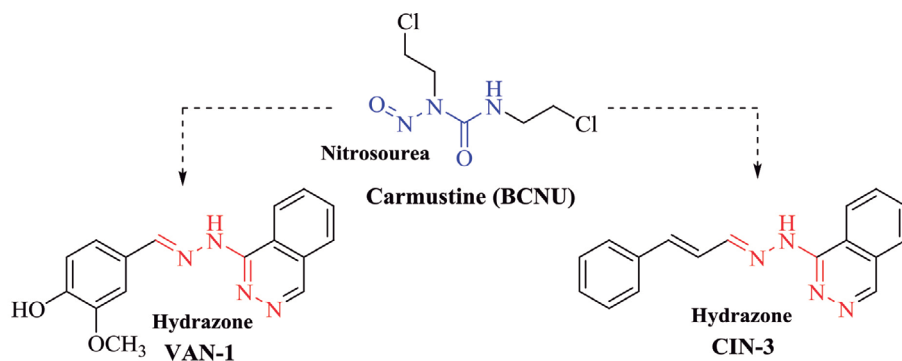
**Figure 4.** Demonstration of the coordination points of the acylhydrazone CIN-2.

As CIN-1 is the simplest hydrazone derivative synthesized from cinnamaldehyde, this result suggests that the modifications made in its structure have negatively influenced the cytotoxicity compared to PC-3 cells of the other derivatives, considering that none of them showed activity for this lineage.

In the tests using glioblastoma cells (SF-295), it was observed that all the tested hydrazones presented cytotoxic activity compared to this cell lineage, where only the compound CIN-4 ( $58.11 \pm 7.03\%$ ) was classified with moderate activity due to its inhibition capacity (GI less than 75%). The other hydrazones presented high cytotoxic activity for SF-295, and increasing activities were found in the following order: CIN-2, VAN-2, CIN-1, CIN-3, and the most active VAN-1, with  $83.50 \pm 0.70\%$  GI for this cell lineage.

The glioblastoma is one of the most aggressive types of cancer that affects the CNS, and like the others it has limitations in the chemotherapy treatment due mainly to its location protected by the BBB, as well as the limited therapeutic arsenal available [22]. Currently, nitrosoureas, especially carmustine (figure 5), are the main therapeutic agents used for the treatment of patients with glioblastoma, but in clinical practice, they present response rates lower than 50.0% [22, 23]; therefore, they need to be combined with other antitumor drugs. A slight structural similarity between the synthesized hydrazones and carmustine is observed, mainly in the arrangement of the nitrogen atoms present in both structures (Figure 5), which can be related to the high activity presented by these hydrazones in front of the glioblastoma lineage.

In general, analyzing the cytotoxic activities *in vitro* of all hydrazones, it was observed that the compound CIN-1 was the phenylhydrazone that was more active in three of the four cancer strains tested, showing excellent bioactivity in relation to leukemia ( $92.37 \pm 3.60\%$ ) and glioblastoma ( $81.53 \pm 1.51\%$ ) cells. Thus, such results demonstrate the potentiality of hydrazones as antitumor, mainly against glioblastomas,



**Figure 5.** Structural comparison between carmustine and hydrazones was tested with higher cytotoxic activity against glioblastoma cells, emphasizing the structural similarity between the compounds.

the tumor cell lineage in which all the derivatives tested presented capacity of cell growth inhibition.

#### ADME/T profile of the hydrazonic derivatives

The pharmacokinetic parameters of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME/T) of the synthesized hydrazones were evaluated using the PreADMET software in order to select the most promising hydrazone of the series as an antineoplastic drug. The prediction of the pharmacokinetic and toxicity profile of these molecules is of paramount importance for the characterization of these compounds and for the planning of future biological trials. The *in silico* results obtained are described in table 1.

To evaluate the absorption profile of the tested hydrazones two main prediction models were analyzed, that of permeability in cells derived from colon adenocarcinoma (Caco-2) and the percentage of human intestinal absorption (HIA). Caco-2 cells present several mechanisms for drug transport through the intestinal epithelium and are used mainly as an *in vitro* model to evaluate the absorption of orally administered drugs. The HIA is the sum of the bioavailability and absorption of the tested compound, evaluated from the ratio of excretion or cumulative excretion in urine, bile and feces [26].

It was observed that the majority of the tested hydrazones presented an excellent intestinal absorption rate, when the AHI percentage was analyzed. It was verified that only the VAN-2 compound presented intermediate absorption when analyzed in this *in silico* model ( $20\% < \text{HIA} < 70\%$ ). This high rate of intestinal absorption reflects

**Table 1.** Pharmacokinetic and toxicity parameters of the new molecular hybrids determined using the PredADMET software.

ADME/T parameters	Hydrazonic compounds					
	VAN-1	VAN-2	CIN-1	CIN-2	CIN-3	CIN-4
<b>Physical-chemistry</b>						
Molecular weight	294.31	332.08	222.29	251.29	274.12	312.29
Log <i>P</i>	3.46 <sup>a</sup>	4.48 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	2.05 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	4.22 <sup>b</sup>
<b>Absorption</b>						
HIA	93.76	53.12	99.59	95.37	96.02	86.59
Caco-2	19.66	3.46	47.15	20.27	23.70	17.32
<b>Distribution</b>						
PPB	88.37	92.44	96.34	86.48	91.49	96.85
BBB	0.13	0.04	4.91	0.14	0.42	0.09
<b>Metabolism</b>						
CYP 3A4	Substrate	Substrate	-	Substrate	-	Substrate
CYP 2C19	Inhibitor	-	Inhibitor	Inhibitor	Inhibitor	-
CYP 2C9	Inhibitor	-	Inhibitor	Inhibitor	Inhibitor	-
CYP 2D6	-	-	-	Inhibitor	-	-
<b>Kidney excretion</b>						
MDCK	0.36	0.09	11.91	175.74	204.09	0.74
<b>Toxicity</b>						
Ames Test	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Carcinogenicity in rats	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive
HERG Inhibition	Medium	Low	Low	Medium	Low	Low

**LogP:** <sup>a</sup>obtained from Souza *et al.* [12] <sup>b</sup>calculated in ChemDraw<sup>®</sup>.

**HIA:** Low absorption 0.0–20.0%; moderate absorption 20.0–70.0%; excellent absorption 70.0–100.0% [24].

**Caco2 cell permeability:** High permeability >70.0 nm.sec<sup>-1</sup>; Medium permeability 4.0–70.0 nm.sec<sup>-1</sup>; Low permeability <4.0 nm.sec<sup>-1</sup> [25];

**PPB:** Strong connection: greater than 90.0%; weak connection: less than 90.0% [24].

**BBB:** High CNS absorption: greater than 2.0; intermediate CNS absorption: between 0.1 and 2.0; low CNS absorption: less than 0.1 [24].

**MDCK:** Low permeability: less than 25.0 nm.sec<sup>-1</sup>; medium permeability: between 25.0 and 500.0 nm.sec<sup>-1</sup>; high permeability: greater than 500.0 nm.sec<sup>-1</sup> [24].

**Ames test:** Positive: mutagenic; Negative: non-mutagenic.

**Carcinogenicity:** Positive: carcinogenic; Negative: non-carcinogenic.

in a high bioavailability of the drug after oral administration, and this is one of the greatest challenges in the development of new antineoplastic [27].

The high absorption of the tested hydrazones is related to their Log *P* values (2.05 - 4.48) which, when compared to their precursors, cinnamaldehyde (Log *P* 1.67) and vanillin (Log *P* 1.27), proved to be superior. Higher Log *P* values obtained for hydrazones indicate greater lipophilicity of these compounds than their precursors, and this fact probably results from the presence of hydrazone function [28], resulting in better absorption by biological membranes.

Therefore, the hydrazone with the best absorption profile in the analyzed model was CIN-1, with HIA equal to 99.59% and permeability in Caco-2 cells equal to 47.15 nm.sec<sup>-1</sup>. These data can be derived from its structural simplicity considering that it is the hydrazone with the lowest molecular mass (222.29 g.mol<sup>-1</sup>) and that does not present ionizable groups in its structure. Such structural and physical-chemical characteristics allow the CIN-1 compound to diffuse more easily through the biological membranes, when compared to the other derivatives of the analyzed series, besides the other transport mechanisms common to the other hydrazones.

For a prediction of the distribution profile of the new hydrazones the ability to bind to plasma proteins (PPL) and the ability to cross the BBB were evaluated. The degree of PPL is of utmost importance for a drug candidate, since the process of its distribution by the body affects the availability, action and consequent efficacy of the drug, and it should be considered for the determination of the appropriate dosage [29]. Thus, it was found that most of the hydrazones analyzed had high affinity for PPL (92.44-99.59%); however, only VAN-1 and CIN-2 showed weak bonding *in silico* tests.

For a good *in vivo* distribution it is considered that the pharmacological effect of the drug is promoted by molecules that are not linked to the carrier proteins [30], since in the free form, such molecules can spread through biological membranes and reach their specific targets [31]. Thus, for a good distribution it is necessary that the drug does not interact so strongly with the plasmatic proteins, so that this connection is easily undone in order to connect it to its pharmacological target. Thus, it can be observed that VAN-1 and CIN-2 presented the desirable distribution profile by the peripheral circulation, so they can perform their cytotoxic functions satisfactorily.

Penetration through BBB is an important pharmacokinetic parameter for the analysis of potential drugs to be considered for the treatment of CNS diseases [24, 29]. Most of the hydrazones tested showed high cytotoxicity compared to glioblastoma cells (table 1), and there is great interest in knowing the BBB absorption profile of these new compounds. Among the hydrazones analyzed, it was observed that CIN-1

presented the highest rate of absorption by BBB, as well as high capacity to inhibit the growth of glioblastomas *in vitro* (CI  $81.53 \pm 1.51\%$ ). Therefore, CIN-1 hydrazone proved to be more promising as a specific antineoplastic agent for glioblastomas. We know that the *in silico* distribution characteristics suggest that, *in vivo*, this derivative is able to reach the glia cells and produce the desired cytotoxic effect in the treatment.

The metabolism of hydrazones was evaluated by the ability to inhibit four enzymes of the cytochrome P450 complex (CYP450), which consists of a family of hepatic enzymes responsible for the metabolism of endogenous and xenobiotic substances in the human body [11]. CYP450 is responsible for the metabolism of approximately 90% of xenobiotics in the human body [32-33], including drugs, which is mainly performed by the CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2D6 [34]. The inhibition of some of these enzymes indicates the potentiality of the drug tested to interact with the metabolism of other drugs that use this same route of biotransformation, making them accumulative and, consequently, toxic to patients [25, 34, 35].

Therefore, it was observed that for the series of hydrazones analyzed only the compounds VAN-2 and CIN-4 were not shown as potential inhibitors of the tested CYP isoforms, as they are potential substrates for CYP3A4 only. This is an ideal characteristic for a potential antineoplastic drug, since chemotherapy for cancer treatment is usually polymedicamentous [36].

The inhibition of some enzyme of the CYP complex can also be correlated with the molecular mass of xenobiotics, so that molecules with lower molecular masses can inhibit more effectively the enzyme by facilitating access to allosteric sites [25]. Observing the *in silico* capacity of CYP inhibition by the analyzed hydrazones, only VAN-2 and CIN-4 were not able to inhibit any of the CYP isoforms, because they are the molecules with higher molecular masses, 332.27 and 312.29  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively.

For analysis of the excretion profile of hydrazones, the MDCK cell permeability model, used to predict the excretion of drugs and other chemicals, was evaluated [24]. Most hydrazones had low permeability to MDCK cells *in silico*, suggesting that these hybrids would have high time of excretion by renal route [30]. In the series of compounds, only CIN-2 and CIN-3 had intermediate permeability.

The toxicity of antineoplastic compounds should also be analyzed, especially parameters such as carcinogenicity, mutagenicity and cardiotoxicity, since most commonly used antineoplastic drugs are mutagenic and teratogenic in *in vivo* tests (animal models) [37]. The model for predicting the capacity of hydrazones to be mutagenic was the Ames test, which was developed in 1972 and which makes use of strains of *Salmonella typhimurium* bacteria, used to evaluate whether the compounds tested

can generate damage to bacterial DNA [38, 39]. In this model, it was verified that all the hydrazones tested were shown as potential mutagenic agents, and this action may be related to cytotoxic activity [40] compared to cancer cell lines presented by these hybrids. Thus, further *in vitro* and *in vivo* studies should be carried out in order to prove the mutagenicity and verify whether the therapeutic benefits of these hydrazones outweigh the risks of their administration [41].

Carcinogenicity should also be a parameter evaluated in the toxicity of antineoplastics, since many of these compounds commonly used in clinical practice have been associated with the development of secondary cancers in treated patients [37, 42, 43]. For the hydrazones analyzed it was found that three of the six derivatives tested *in silico* showed no carcinogenic activity in rats, these being the derivatives of cinnamaldehyde CIN-1, CIN-2 and CIN-3, indicating a relevant safety rate in this parameter.

The cardiotoxicity of antineoplastics is one of the most devastating sequels of cancer therapy [43] and should also be evaluated in the development of new antineoplastics. The inhibition of the human gene homologous to *ether-a-go-go* (HERG) results in compromised expression of the HERG channels (cardiac channels of K<sup>+</sup>) and the consequent appearance of cardiac problems, in some fatal cases, caused by the administration of the drug [39]. Thus, the toxicity evaluation of new antineoplastic agents must take into consideration, among other parameters, the action of drugs on the HERG gene. Thus, it was observed that the tested hydrazones present an intermediate to low risk in inhibiting the expression of the HERG gene and, consequently, they are not potentially cardiotoxic derivatives according to the *in silico* tests.

After evaluation of the pharmacokinetic profile of the six synthesized hydrazones, it was observed, in a general way, that the hydrazones present promising characteristics of intestinal absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. As antineoplastic multi-target drugs, the hydrazones derived from cinnamaldehyde, the compounds CIN-1 and CIN-2, which showed high cytotoxic activity compared to leukemia cell lines (HL-60) and glioblastomas, stand out (SF-295). In addition, it was observed that CIN-2 presented the most promising ADME/T *in silico* profile, showing high intestinal absorption, desirable distribution profile related to plasma protein binding, good renal excretion and low toxicity. In addition, the ADME/T profile of CIN-1 highlights its use as a promising antineoplastic agent with action in the CNS, more specifically in the treatment of glioblastomas.

Among the series analyzed, it was observed that the hydrazones derived from cinnamaldehyde, CIN-1 and CIN-2, presented high cytotoxic activity *in vitro* compared to two (HL-60 and SF-295) of the four tested cancer cell lines.

When analyzing the ADME/T profile, it was observed that the hybrid CIN-2, the only acylhydrazone of the synthesized series, obtained, in general, better pharmacokinetic characteristics, with emphasis on absorption, distribution, renal excretion and toxicity, and was the most promising hydrazone of the series.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Federal University of the Valley of the San Francisco, Federal University of Ceará, and Federal University of Piauí.

## CONFLICT OF INTERESTS

We declare that there is not any conflict of interests.

## REFERENCES

1. J.A. Somarelli, H. Gardner, V.L. Cannataro, E.F. Gunady, A.M. Boddy, N.A. Johnson, J.N. Fisk, S.G. Gaffney, J.H. Chuang, S. Li, F.D. Ciccarelli, A.R. Panchenko, K. Megquier, S. Kumar, A. Dornburg, J. De Gregori, J.P. Townsend, Molecular biology and evolution of cancer: from discovery to action, *Mol. Biol. Evol. Cancer*, **37**, 320-326 (2019).
2. A. Billington, D. Dayicioglu, P. Smith, J. Kiluk, Review of procedures for reconstruction of soft tissue chest wall defects following advanced breast malignancies, *Cancer Control.*, **26**, 1073274819827284, 7 pages (2019).
3. L. Falzone, S. Solomone, M. Libra, Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1300, 26 pages (2018).
4. L.P. Figueiredo, A.L. Ibiapino, D.N. Amaral, L.S. Ferraz, T. Rodrigues, E.J. Barreiro, L.M. Lima, F.F. Ferreira, Structural characterization and cytotoxicity studies of different forms of a combretastatin A4 analogue, *J. Mol. Struct.*, **1147**, 226-234 (2017).
5. R. Fanciullino, J. Ciccolini, G. Milano, Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: a focus on nano-albumin-bound drugs, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **88**, 504-513 (2013).

6. D. Saini, M. Gupta, Hydrazones as potential anticancer agents: An update, *Asian J. Pharm. Pharmacol.*, **4**, 116-122 (2018).
7. L.N. Suvarapu, K.Y. Seo, S.-O. Baek, V.R. Ammireddy, Review on analytical and biological applications of hydrazones and their metal complexes, *E-J. Chem.*, **9**, 1288-1304 (2012).
8. K. Mokhnache, K. Hanane, E-K. Soltani, S. Madoui, A. Karbab, N. Charef, L. Arrar, Hydrazones: origin, reactivity and biological activity. *Adv. Biores.*, **10**, 1-9 (2019).
9. V. Alves, R.C. Braga, E.N. Muratov, C.H. Andrade, Químioinformática: uma introdução, *Quím. Nova*, **41**, 202-213 (2017).
10. M. González-Medina, J.J. Naveja, N. Sanchez-Cruz, J.L. Medina-Franco, Open chemoinformatic resources to explore the structure, properties and chemical space of molecules. *RSC Adv.*, **7**, 54153-54163 (2017).
11. L.L.G. Ferreira, A.D. Andricopulo, ADMET modeling approaches in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **24**, 1157-1165 (2019).
12. D.C.M. Souza, V.C. Sousa, L.P.L. Cruz, S.M.P. Carneiro, M.M.M. Alves, F.A.A. Carvalho, M.P. Costa, C.M. Corrêa, A.A. Gonsalves, C.R.M. Araújo, Síntese, atividade antileishmania e citotóxica de hidrazonas derivadas de aldeídos naturais, *Quím. Nova*, **43**, 50-57 (2020).
13. L.G. da S. Souza, M.C.S. Almeida, T.L.G. Lemos, P.R.V. Ribeiro, E.S. Brito, V.L.M. Silva, A.M.S. Silva, R. Braz-Filho, J.G.M. Costa, F.G. Rodrigues, F.S. Barreto, M.O. Moraes, Synthesis, antibacterial and cytotoxic activities of new biflorin-based hydrazones and oximes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 435-439 (2016).
14. I. Graça, E.J. Souza, P. Costa-Pinheiro, F.Q. Vieira, J. Torres-Ferreira, M.G. Martins, R. Henrique, C. Jerónimo, Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer, *Oncotarget*, **5**, 5950-5964 (2014).
15. M.J. Ruiz-Magaña, R. Martínez-Aguilar, E. Lucendo, D. Campillo-Davo, K. Schulze-Osthoff, C. Ruiz-Ruiz, The antihypertensive drug hydralazine activates the intrinsic pathway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells, *Oncotarget*, **7**, 21875-21886 (2016).
16. X.-P. Zou, B. Zhang, Y. Liu, More questions than answers about the potential anti-cancer agents: DNA methylation inhibitors, *Chin. Med. J.*, **123**, 1206-1209 (2010).



17. M. Candelaria, A. Herrera, J. Labardini, A. González-Fierro, C. Trejo-Becerril, L. Taja-Chayeb, E. Pérez-Cárdenas, E. Cruz-Hernández, D. Arias-Bofill, S. Vidal, E. Cervera, A. Dueñas-Gonzalez, Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial, *Ann. Hemat.*, **90**, 379-387 (2011).
18. Q. Yao, J. Qi, Y. Zheng, K. Qian, L. Wei, M. Maimaitiyiming, Z. Cheng, Y. Wang, Synthesis, anticancer activity and mechanism of iron chelator derived from 2,6-diacetylpyridine bis(acylhydrazones), *J. Inorg. Biochem.*, **193**, 1-8 (2019).
19. M. Hout, L. Dos Santos, A. Hamai, M. Mehrpour, A promising new approach to cancer therapy: Targeting iron metabolism in cancer stem cells, *Semin. Cancer Biol.*, **53**, 125-138 (2018).
20. V.F.S. Pape, S. Tóth, A. Furedi, K. Szebényi, A. Lovrics, P. Szabó, M. Wiese, G. Szakács, Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance, *Eur. J. Med. Chem.*, **117**, 335-354 (2016).
21. G.S.S. Firmino, S.C. André, Z. Hastenreiter, V.K. Campos, M.A.L. Abdel-Salam, E.M. Souza-Fagundes, J.A. Lessa, *In vitro* assessment of the cytotoxicity of Gallium (III) complexes with isoniazid-derived hydrazones: effects on clonogenic survival of HCT-116 cells, *Inorg. Chim. Acta*, **497**, 119079 (2019).
22. E.G. Figueiredo, J.W.V.F. Faria, M.J. Teixeira, Treatment of recurrent glioblastoma with intra-arterial BCNU [1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea], *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, **68**, 778-782 (2010).
23. T. Reithmeier, E. Graf, T. Piroth, M. Trippel, M.O. Pinsker, G. Nikkhah, BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors, *BMC cancer*, **10**, 30, 8 pages (2010).
24. S.-N. Zhang, X.-Z Li, X.-Y. Yang, Drug-likeness prediction of chemical constituents isolated from Chinese materia medica Ciwujia, *J. Ethnopharmacol.*, **198**, 131-138 (2017).
25. M.F. Dolabela, A.R.P. da Silva, L.H. Ohashi, M.L.C. Bastos, M.C.M. da Silva, V.V. Vale, Estudo *in silico* das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Revista Fitos*, **12**, 227-242 (2018).

26. R.E. Kartasasmita, A. Muhtadi, S. Ibrahim, Binding affinity of asiatic acid derivatives design against inducible nitric oxide synthase and ADMET prediction, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **4**, 75-80 (2014).
27. S. Nandi, M.C. Bagchi, QSAR modeling of 4-anilinofuro [2, 3-b] quinolines: an approach to anticancer drug design, *Med. Chem. Res.*, **23**, 1672-1682 (2014).
28. H. Kumar, D. Malhotra, R. Sharma, E. Sausville, M. Malhotra, Synthesis, characterization and evaluation of isoniazid analogues as potent anticancer agents, *Pharmacologyonline*, **3**, 337-343 (2011).
29. S.Z. Kovačević, L. Jevrić, S.O.P. Kuzmanović, E.S. Lončar, Prediction of *in silico* ADME properties of 1, 2-O-isopropylidene aldohexose derivatives, *Iran. J. Pharm. Res.*, **13**, 899-907 (2014).
30. L. Xu-Zhao, S.-N. Zhang, X.-Y. Yang, Combination of cheminformatics and bioinformatics to explore the chemical basis of the rhizomes and aerial parts of *Dioscorea nipponica* Makino, *J. Pharm. Pharmacol.*, **69**, 1846-1857 (2017).
31. Nursamsiar, A.T. Toding, A. Awaluddin, *In-silico* study chalcone and pyrimidine analog derivatives as anti-inflammatory: prediction of absorption, distribution, and toxicity, *Pharmacy*, **13**, 92-100 (2016).
32. D. Wang, Y. Guo, S.A. Wrighton, G.E. Cooke, W. Sadee, Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs, *Pharmacogenomics J.*, **11**, 274-286 (2011).
33. P. Wang, K. Pradhan, X. Zhong, X. Ma, Isoniazid metabolism and hepatotoxicity, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 384-392 (2016).
34. S.K. Paramashivam, K. Elayaperumal, B.B. Natarajan, M.D. Ramamoorthy, S. Balasubramanian, K.N. Dhiraviam, *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases, *Bioinformation*, **11**, 73-84 (2015).
35. Y. Sicak, E.E. Oruç-Emre, M. Ozturk, T. Taskin-Tok, A. Karakucuk-Iyidogan, Novel fluorine-containing chiral hydrazide-hydrazones: design, synthesis, structural elucidation, antioxidant and anticholinesterase activity, and *in silico* studies, *Chirality*, **31**, 603-615 (2019).
36. H. Woopen, R. Richter, F. Ismael, R. Chekerov, I. Roots, T. Siepmann, J. Schouli, The influence of polypharmacy on grade III/IV toxicity, prior discontinuation of

- chemotherapy and overall survival in ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.*, **140**, 554-558 (2016).
37. A. Buschini, D. Dayicioglu, P. Smith, J. Kiluk, Multicentre study for the evaluation of mutagenic/carcinogenic risk in nurses exposed to antineoplastic drugs: assessment of DNA damage, *Occup. Environ. Med.*, **70**, 789-794 (2013).
  38. B.N. Ames, E.G. Gurney, J.A. Miller, H. Bartsch, Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 3128-3132 (1972).
  39. R.K.P. Tripathi, S.R. Ayyannan, Evaluation of 2-amino-6-nitrobenzothiazole derived hydrazones as acetylcholinesterase inhibitors: *in vitro* assays, molecular docking and theoretical ADMET prediction, *Med. Chem. Res.*, **27**, 709-725 (2018).
  40. K. Kümmerer, A. Haiß, A. Schuster, A. Hein, I. Ebert, Antineoplastic compounds in the environment—substances of special concern, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 14791-14804 (2016).
  41. B. Kopp, R. Schierl, D. Nowak, Evaluation of working practices and surface contamination with antineoplastic drugs in outpatient oncology health care settings, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **86**, 47-55 (2013).
  42. M. Villarini, L. Dominici, R. Piccinini, C. Fatigoni, M. Ambrogi, G. Curti, P. Morucci, G. Muzi, S. Monarca, M. Moretti, Assessment of primary, oxidative and excision repaired DNA damage in hospital personnel handling antineoplastic drugs, *Mutagenesis*, **26**, 359-369 (2010).
  43. E. Senkus, J. Jassem, Cardiovascular effects of systemic cancer treatment, *Cancer Treat. Rev.*, **37**, 300-311 (2011).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

V.L. dos Anjos-Santos, A. de Assis-Gonçalves, M.F. Souza-Silva, F. de C. Evangelista de Oliveira, M. Pinheiro da Costa, C.O. Pessoa, C.R.M. Araújo, Hydrazones derived from natural aldehydes: *in vitro* cytotoxic evaluation and *in silico* pharmacokinetic predictions, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 217-235 (2021).

## Actividad antioxidante de cuatros especies vegetales del nordeste argentino

Ariadna Soledad Soro\*, Gabriela Malena Valenzuela, María Beatriz Núñez

Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

\*Autora para correspondencia: [ariadna@uncaus.edu.ar](mailto:ariadna@uncaus.edu.ar)

Recibido: 31 de julio de 2020

Revisado: 7 de diciembre de 2020

Aceptado: 9 de diciembre de 2020

### RESUMEN

**Objetivos:** determinar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *S. haematospermum*; *P. niruri*; *P. tenellus*; *E. serpens*. **Metodología:** la composición fitoquímica se analizó por cromatografía en capa fina y la actividad antioxidante se observó de modo cualitativo por ensayo autográfico. Los fenoles totales se cuantificaron con el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides totales con la reacción de complejación de aluminio. Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron las técnicas de decoloración del radical libre DPPH• (2,2- difenil-1-picrilhidracilo) y del radical catión ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) y del poder reductor del catión hierro (III). **Resultados:** el estudio fitoquímico evidenció en todas las especies la presencia de metabolitos bioactivos. El contenido de fenoles totales osciló entre:  $627,71 \pm 1,45$  y  $369,8 \pm 52,6$  mg EAG/g muestra y de flavonoides totales fue de  $12,2 \pm 0,1$  hasta  $4,5 \pm 0,3$  mg Q/g muestra. Las especies *S. haematospermum* y *P. tenellus* presentaron mayor contenido de polifenoles. Los ensayos de actividad antioxidante permitieron reconocer que *S. haematospermum* y *P. tenellus* tienen capacidad de mayor inhibición de los radicales libres probados y mostraron mayor poder reductor los extractos hidroalcohólicos *S. haematospermum* y *P. niruri*.

*Palabras claves:* Radicales libres, polifenoles, *Euphorbiaceae*, *Phyllanthaceae*.

## SUMMARY

### Antioxidant activity of four plant species in the Argentine Northeast

**Objectives:** To determine the phytochemical composition and evaluate the antioxidant activity of the hydroalcoholic extracts of *S. haematospermum*; *P. niruri*; *P. tenellus*; *E. serpens*. **Methodology:** The phytochemical composition was analyzed by thin layer chromatography and the antioxidant activity was observed qualitatively by autographic assay. Total phenols were quantified with the Folin-Ciocalteu method and total flavonoids with the aluminum complexation reaction. To determine the antioxidant activity, the discoloration techniques of the free radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil) and of the cation radical ABTS•+ (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) and the reducing power of the iron (III) cation. **Results:** The phytochemical study showed the presence of bioactive metabolites in all species. The total phenol content ranged from:  $627.71 \pm 1.45$  to  $369.8 \pm 52.6$  mg EAG / g sample and total flavonoids was  $12.2 \pm 0.1$  to  $4.5 \pm 0.3$  mg Q / g sample. The species *S. haematospermum* and *P. tenellus* presented higher content of polyphenols. The antioxidant activity tests allowed recognizing that *S. haematospermum* and *P. tenellus* have a capacity for greater inhibition of the tested free radicals and the hydroalcoholic extracts *S. haematospermum* and *P. niruri* showed greater reducing power.

*Key words:* Free radicals, polyphenols, *Euphorbiaceae*, *Phyllanthaceae*.

## RESUMO

### Atividade antioxidante de quatro espécies de plantas no Nordeste argentino

**Objetivos:** determinar a composição fitoquímica e avaliar a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *S. haematospermum*; *P. niruri*; *P. tenellus*; *E. serpens*. **Metodologia:** a composição fitoquímica foi analisada por cromatografia em camada delgada e a atividade antioxidante foi observada qualitativamente por ensaio autográfico. Fenóis totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e flavonóides totais pela reação de complexação de alumínio. Para determinar a atividade antioxidante, as técnicas de descoloração do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

e do radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico ácido) e o poder redutor do cátion ferro (III). **Resultados:** o estudo fitoquímico mostrou a presença de metabólitos bioativos em todas as espécies. O conteúdo total de fenol variou de:  $627,71 \pm 1,45$  a  $369,8 \pm 52,6$  mg EAG / g amostra e flavonóides totais foi de  $12,2 \pm 0,1$  a  $4,5 \pm 0,3$  mg Q / g amostra. As espécies *S. haematospermum* e *P. tenellus* apresentaram maior teor de polifenóis. Os testes de atividade antioxidante permitiram reconhecer que *S. haematospermum* e *P. tenellus* apresentam maior capacidade de inibição dos radicais livres testados e os extratos hidroalcoólicos *S. haematospermum* e *P. niruri* apresentaram maior poder redutor.

*Palavras-chave:* Radicais livres, polifenóis, *Euphorbiaceae*, *Phyllanthaceae*.

## INTRODUCCIÓN

La familia *Euphorbiaceae* es una gran familia de distribución cosmopolita. Se trata de una amplia familia con más de 7000 especies reunidas en 240 géneros, que son más abundante en regiones tropicales de Sudamérica y África. Para Argentina se han citado 29 géneros y 216 especies; de las cuales, unos 20 géneros son indígenas de Salta y 12 se localizaron en el valle de Lerma [1]. Entre las especies nativas de esta familia en el nordeste argentino están *Acalypha communis*, *Cnidocolus loasoides*, *Croton bonplandianus*, *Euphorbia serpens*, *Jatropha isabelli*, *Sapium haematospermum* y *Sebastiania schottiana* [2]. Actualmente, sus usos más frecuentes son en alimentación (con la mandioca) y en la producción de medicinas, venenos, aceites y grasas, ceras, gomas, caucho y componentes para pinturas, barnices y otros productos industriales. Algunas de ellas se cultivan como ornamentales [3]. Muchos compuestos extraídos de las euforbiáceas tienen propiedades farmacológicas de gran potencial. Se reconocen sustancias con actividades anticancerígena, antimicrobiana, antimicótica, antiulcerosa, tripanocida, vasorelajante, antiinflamatoria, analgésica, antimalárica, citotóxica, antiséptica, antiviral, antimutagénica, lipolítica y antioxidante [4, 5].

*Sapium haematospermum* Müll. Arg., en medicina popular, su látex es utilizado para calmar el dolor de muelas; la decocción de las hojas es febrífuga y combate los dolores reumáticos, mientras que su corteza es empleada en cataplasmas para cicatrizar heridas [6]. *Euphorbia serpens* (yerba meona, golondrina) es una planta tradicionalmente empleada como diurética, el látex como antitumoral, purgante drástico y en uso externo contra enfermedades o problemas de la piel (callo, verrugas, herpes, tatuajes) [7-9].

En APG II Angiosperm Phylogenetic Group [10], la familia *Euphorbiaceae* fue dividida en 4 familias: *Euphorbiaceae* s. str., *Phyllanthaceae*, *Picodendraceae* y *Putranjivaceae*.

De acuerdo con esta clasificación, en la familia *Euphorbiaceae* están incluidos los géneros que se caracterizan por ser uniovulados, mientras que en la familia *Phyllanthaceae* se incluyen los géneros biovulados [2, 11].

Otra familia *Phyllanthaceae* se encuentran ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo [12] son muy utilizadas en la medicina popular para trastornos urinarios, infecciones intestinales, diabetes y hepatitis B. *Phyllanthus niruri* es una especie conocida como “quebra-pedra” (Brasil), “helechito”, “sarandicito” (Argentina), entre otros. La planta es nativa de América; sudeste de Brasil, noroeste argentino (Misiones, Formosa y Chaco), sur de Paraguay y este de Uruguay. Empleada popularmente en todo el continente para eliminar pequeños cálculos renales y vesiculares, con propiedades diurética, antidiabética, antirreumática, uricosúrica, sudorífica, sedante, tónica, eupéptica y protectora hepática [13, 14].

*Phyllanthus tenellus* Roxb., conocida popularmente en Brasil como “quebra-pedra” y “erva-pombinha”. Las propiedades medicinales de esta especie están relacionadas con la eliminación de cálculos renales, actividad diurética, hipoglucemiante y en el tratamiento de las infecciones del hígado [15].

El estudio de componentes bioactivos como los polifenoles totales presentes en los extractos hidroalcohólicos nos aportarán información para explicar su potencial acción antioxidante. Esta actividad está relacionada con la prevención de enfermedades crónicas. El desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones ocurre por el daño inducido por los radicales libres, los cuales causan la oxidación de las macromoléculas biológicas que no siempre pueden contrarrestarse por los sistemas de defensa antioxidante del organismo. Las sustancias antioxidantes extraídas de plantas serían beneficiosas ante patologías como infecciones, enfermedades inflamatorias, diabetes, etc. [16].

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Sapium haemospermum*, *Phyllanthus niruri*, *P. tenellus* y *Euphorbia serpens*.

## METODOLOGÍA

### Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Las especies en estudio se recolectaron durante los meses de febrero, marzo y abril del 2018, en la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia del Chaco. La localización por coordenadas fue para *Sapium haemospermum* (s) 26°46'22,6" (w) 60°25'46,6", *Phyllanthus niruri* (s) 26°46'36,9" (w) 60°25'79,8", *Phyllanthus*

*tenellus* (s) 26°46'37,2" (w) 60°25'78,5", y *Euphorbia serpens* (s) 26°46'38,2" (w) 60°25'77,9". Un ejemplar de cada especie fue herborizado y depositado con el código: CTES0060491, CTES0061228, CTES0061227, CTES0061229, respectivamente; en el Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

El material vegetal para el trabajo se secó a la sombra y a temperatura ambiente durante 7 días. Luego se procedió con molinillo de cuchilla a la pulverización de la droga y posterior tamización para definir la granulometría de polvo. Dicho polvo se conservó en frasco de vidrio color caramelo y de cierre hermético hasta su empleo en el proceso de extracción.

### Preparación de los extractos

Los extractos de las cuatro especies vegetales se prepararon siguiendo el método de maceración descrito por *Farmacopea argentina* [17], obteniendo tinturas. Para eso se pesaron 20 g de cada material vegetal en polvo y se colocaron en frasco color caramelo, añadiendo 100 ml de EtOH al 70% (v/v). El mismo se dejó en contacto durante 7 días a temperatura ambiente y con agitación periódica. Finalmente, el líquido extractivo se separó por filtración a presión reducida y se dispuso en botellas color caramelo de buen cierre y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

### Caracterización fitoquímica cualitativa de los extractos

La detección de metabolitos secundarios se efectuó por cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos hidroalcohólicos (correspondientes a las cuatro especies vegetales). Se usaron placas con sílica gel 60 (Merck, 10 x 10) y como eluyente se utilizó la mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido acético (36:12:5). La placa cromatográfica se reveló por aspersión del reactivo NP (ácido 2-amino-etil éster difenilbórico al 1% en metanol (p/v) y se visualizó a la luz visible y a la luz UV a una longitud de onda de 365 nm [18].

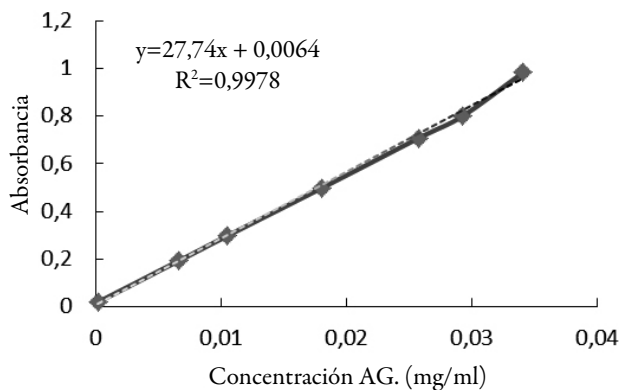
### Ensayo cualitativo de actividad antioxidante

Se realizó la siembra de una alícuota 10 µl de extracto de cada especie medicinal y de los patrones de referencia quercetina y catequina (0,1 mg/ml) sobre 2 placas TLC de silicagel 60 Merck (10 x 10 cm); utilizando como fase móvil cloroformo: metanol (9,5: 0,5 v/v) como eluyente. Una placa se asperjó con una solución de ABTS<sup>•+</sup> de color verde y la otra placa con una solución de DPPH<sup>•</sup> de color violeta (ambas soluciones preparadas 1 mg/ml en EtOH 70 %); se dejaron secar a temperatura ambiente 15 min. Los componentes activos de cada extracto con capacidad antioxidante se visualizaron por decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, sobre la banda activa (autografía en bandas).



### Cuantificación de fenoles totales

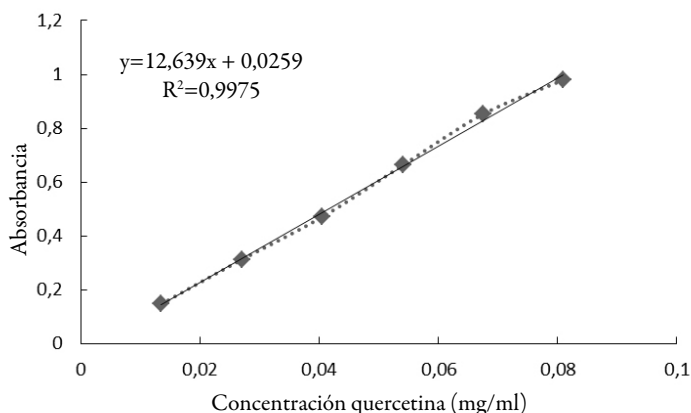
El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Singleton *et al.* [19], que se fundamenta en que los compuestos fenólicos reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo de tungsteno y molibdato) formando un complejo azulado que absorbe a 765 nm. En un tubo de ensayo se colocó 50  $\mu\text{l}$  de extracto, se agregaron 1650  $\mu\text{l}$  de agua deionizada y 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu; después de 2 min se agregó 200  $\mu\text{l}$  de carbonato de sodio (20 %). Cada tubo de reacción se incubó a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y luego se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu). Se realizó la curva de calibración con una solución alcohólica de ácido gálico (1 mg/ml) (figura 1). Los resultados de la reacción de los extractos fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g MS). Este ensayo se efectuó por triplicado para cada extracto.



**Figura 1.** Curva de calibración de ácido gálico (AG) .

### Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método modificado de complejación con nitrato de aluminio de Look *et al.* [20]. En la reacción se coloca 30  $\mu\text{l}$  del extracto hidroalcohólico con 120  $\mu\text{l}$  de la solución de acetato de potasio (1 M) y 120  $\mu\text{l}$  de nitrato de aluminio al 10% y se llevó a 2730  $\mu\text{l}$  de volumen con EtOH 70%. Se dejó reposar por 40 min y se procedió a leer la absorbancia a 415 nm en espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu). Se realizó la curva de calibración con una solución alcohólica de quercetina (Q) (2,7 mg/ml EtOH 70 %) (figura 2). Los resultados del contenido de flavonoides en los extractos se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg Q/g MS).



**Figura 2.** Curva de calibración de quercetina (Q).

## Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante

### *Método con radical DPPH•*

Los ensayos de inhibición de radicales DPPH• se hicieron utilizando el método descrito por Brand-Williams *et al.* [21] con algunas modificaciones. Este método está basado en la reducción de una solución alcohólica de DPPH• en presencia de un antioxidante donador de hidrogeno como los extractos vegetales. Este radical fue disuelto en EtOH 70° (0,004% p/v); se tomaron 1000 µl de solución de DPPH• y se midió la absorbancia a 515 nm hasta tener una absorbancia de 0,9, luego se agregaron alícuotas de cada uno de los extractos a diferentes concentraciones. Se agitó el contenido de los tubos, se dejó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro UV-visible (1800 Shimadzu) y la disminución de las mismas fue registrada a intervalos de 0,5 min durante 7 min. Los resultados se expresaron como porcentajes de actividad de captación de radicales (% AAR), calculados como:

$$\% \text{ AAR} = \frac{1 - \text{muestra}}{\text{control}} \cdot 100$$

El reactivo Trolox se usa como antioxidante de referencia y la actividad se expresa como el valor de IC50 que representa la cantidad de extracto que inhibe el 50% del radical libre DPPH•.

*Método con radical catión ABTS<sup>•+</sup>*

Otro método probado para evaluar la actividad antioxidante fue el ensayo de decoloración del catión radical ABTS<sup>•+</sup>. En este caso se usó la metodología desarrollada por Re *et al.* [22] y descrita por Kuskoski *et al.* [23]. El radical ABTS<sup>•+</sup> se obtiene tras la reacción del reactivo ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM) incubado a temperatura ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical catión ABTS<sup>•+</sup> se diluye con EtOH hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ( $\pm$  0,1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Luego a 1000  $\mu$ l de la solución de ABTS<sup>•+</sup> se adicionaron alícuotas de extracto (distintas concentraciones) y se midió a 754 nm la absorbancia de la misma a los 6 min en espectrofotómetro UV-visible (UV-1800, Shimadzu). El reactivo Trolox se usa como antioxidante de referencia y la actividad se expresa como el valor de IC50 que representa la cantidad de extracto que inhibe el 50% del radical ABTS<sup>•+</sup>. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

*Poder reductor*

La capacidad de las especies vegetales para reducir el Fe (III) a Fe (II) se determinó por espectrofotometría UV-visible de acuerdo con la técnica descrita por Oyaizu *et al.* [24] con modificaciones. Esta técnica se basa en la formación de ferrocianuro de potasio, este compuesto reacciona con el FeCl<sub>3</sub> produciéndose una intensa coloración verde esmeralda que absorbe a 700 nm, cuya intensidad es dependiente de la concentración de los antioxidantes que se encuentran en la muestra. Cuanto mayor sea la absorbancia en el medio de reacción, mayor será el poder reductor de las sustancias antioxidantes que se evalúan [25].

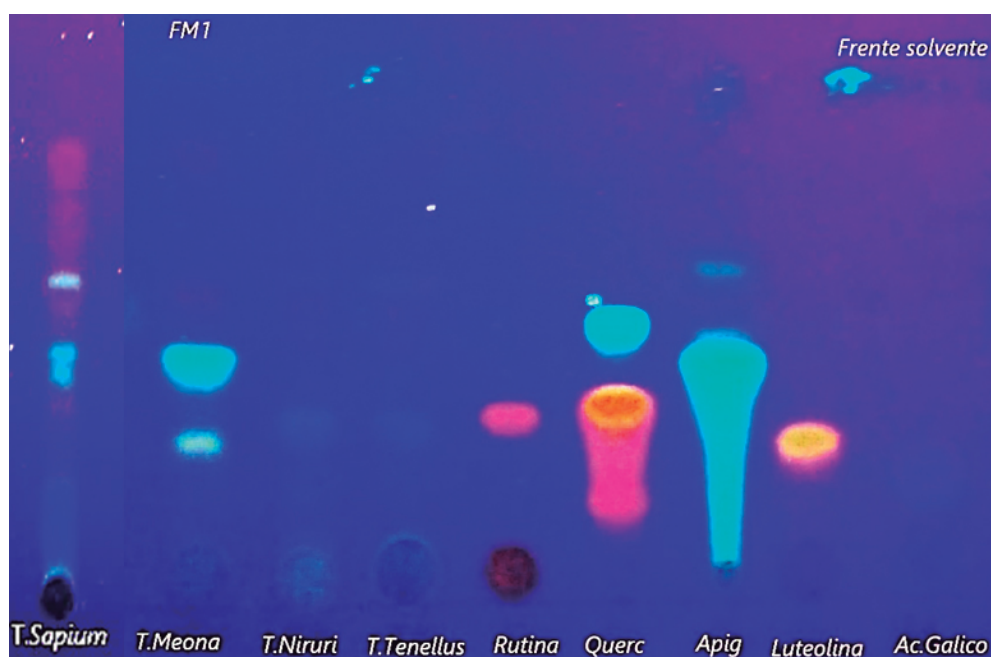
Para este ensayo se mezcló 200  $\mu$ l de extracto (distintas concentraciones) con 500  $\mu$ l de tampón fosfato (0,5 mol/L, pH7) y 500  $\mu$ l de una disolución de ferricianuro de potasio (1 %). La mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA 10 %) y se agitó con vortex por 5 min. Parte de la solución sobrenadante (1000  $\mu$ l) fue mezclada con 2000  $\mu$ l de agua destilada y 500  $\mu$ l FeCl<sub>3</sub> (0,1 %), y se repite la agitación con vortex. Finalmente, se determinó la absorbancia a 700 nm. Se consideró el aumento de la absorbancia como indicador del poder reductor de los extractos.

*Análisis de datos*

Se utilizó el procedimiento de análisis de varianza (Anova) mediante el programa estadístico *Statgraphics Plus*. Los resultados se expresaron como media/desviación estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

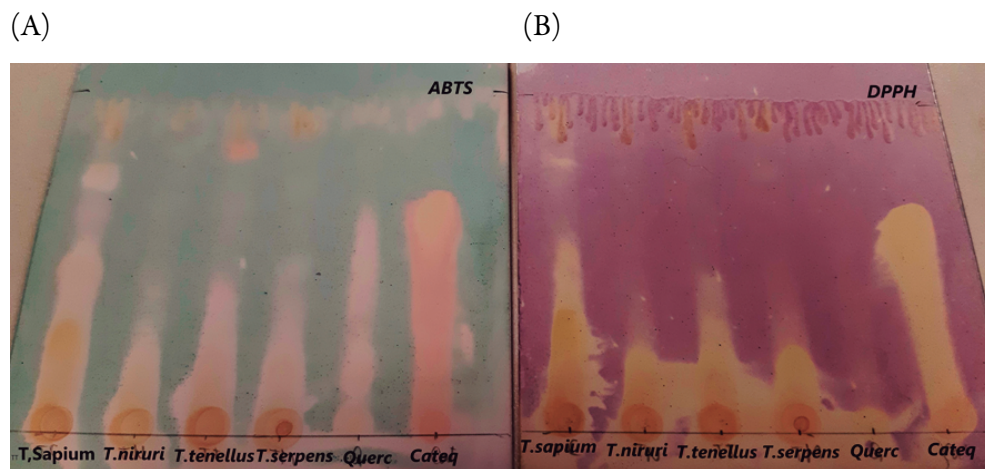
En la caracterización fitoquímica por cromatografía CCF (figura 3), la especie *S. haematospermum* mostró una banda azul que coincide con el testigo ácido gálico (Rf 0,17); banda amarilla (Rf 0,33) que coincide con el testigo rutina y una banda celeste (Rf 0,41) que concuerda con el testigo apigenina. *E. serpens* presentó una banda amarilla (Rf 0,3) coincidente con el patrón luteolina, y una banda verde (Rf 0,33) que coincide con el patrón de apigenina. Respecto a *P. niruri* mostró bandas azul (Rf 0,33) coincidente con el ácido gálico. *P. tenellus* presentó una banda azul que coincide con el patrón de ácido gálico. Este ensayo fitoquímico evidenció en todas las especies la presencia de flavonas (luteolina, apigenina), flavonol (rutina) y ácidos fenólicos (ácido gálico) los cuales coinciden con los reportados por da Silva *et al.* [26], Gratti *et al.* [27], Nascimento *et al.* [28], Sandini *et al.* [15], Sobreira *et al.* [29], Bagalkotkar *et al.* [30] y Calixto *et al.* [12].



**Figura 3.** Cromatograma de los extractos hidroalcohólicos y patrones de referencia.

Los resultados obtenidos del ensayo cualitativo de actividad antioxidante (figura 4) mostraron que los extractos de *S. haematospermum*, *P. niruri*, *P. tenellus* y *E. serpens* presentaron actividad al exhibir bandas de color blancas-amarillentas sugiriendo la presencia de componentes bioactivos con actividad antioxidante. Todos los extractos presentaron una banda que coincide con el testigo de quercetina (Rf 0,4) al asperjarlo

con  $ABTS^{\bullet+}$  y *S. haematospermum* se destacan porque presentan una banda que coincide con el patrón catequina ( $R_f$  0,5) al asperjarlo con el radical DPPH•. Teniendo en cuenta que el radical DPPH• permite determinar compuestos con características polares y el radical  $ABTS^{\bullet+}$  compuestos con características más apolares; este ensayo cualitativo es un medio rápido; simple porque es colorimétrico (no requiere equipo analítico); sensible ya que no necesita grandes cantidades de antioxidante y muestra, lo cual permitió detectar rápidamente los compuestos bioactivos con potencial capacidad antioxidante presentes en estas especies vegetales.



**Figura 4.** Autografía en bandas de los extractos hidroalcohólicos revelados con radical  $ABTS^{\bullet+}$  (A) y con radical DPPH• (B).

Recientemente, no se encontraron reportes sobre el contenido de fenoles totales (TPC) de la especie *S. haematospermum*; sin embargo, este valor se ha determinado para la especie *S. glandulosum* perteneciente a la misma familia, cuyos valores de TPC son  $280,68 \pm 6,36$  (mg TAE/g PS) y TFC  $312,56 \pm 7,34$  (mg RE/g PS). Además, se observó que *S. haematospermum* presentó un valor superior de TPC y un valor inferior de contenido de flavonoides totales (TFC) a los informados por Silva *et al.* [31] (tabla 1). Respecto a *P. tenellus* presento valores mayores de TPC a los reportados por Sobreira *et al.* [29] cuyo valor fue de  $271,97 \pm 5,45$  (mg EAG/g PS). Sin embargo, *P. niruri* presenta valores superiores de contenidos fenólicos a los reportados por Amin *et al.* [32], Gularte *et al.* [33-34] y Mahdi *et al.* [35], los cuales varían entre  $90,53 \pm 2,50$  y  $270 \pm 3,0$  (mg EAG/g) y valores inferiores de flavonoides totales ( $123,9 \pm 2,0$  mg EQ/g) a los informados por Amin *et al.* [32]. Por último, *E. serpens* obtuvo un valor de  $369,8 \pm 52,6$  (mg EAG/g) TPC, mayor a lo informado por Gratti *et al.* [27]. También es posible observar que existe una correlación entre los resultados del contenido de

flavonoides totales presentados y los de fenoles totales puesto que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos. La importancia de la presencia de fenoles y flavonoides radica en su actividad como antioxidantes. Estudios recientes han demostrado que muchos constituyentes polifenólicos derivados de plantas son antioxidantes más eficaces *in vitro* que las vitaminas E o C, y, por tanto, podrían contribuir significativamente a los efectos de protección *in vivo* [36].

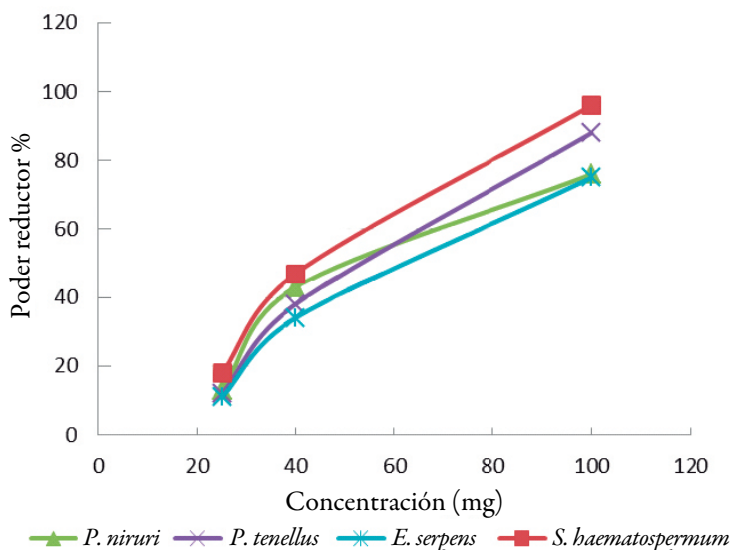
**Tabla 1.** Fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.

Muestras	Fenoles totales (mgAG/g MS)	Flavonoides (mgQE/g MS)	Actividad antioxidante IC50	
			DPPH• (mg/ml)	ABTS <sup>•+</sup> (mg/ml)
<i>S. haematospermum</i>	627,7 ± 1,5	12,2 ± 0,1	5,12 ± 1,23	0,6 ± 0,01
<i>P. tenellus</i>	494,6 ± 37,9	7,2 ± 0,3	3,4 ± 0,94	0,71 ± 0,08
<i>P. niruri</i>	444,9 ± 43,2	6,9 ± 0,3	3,42 ± 0,08	0,72 ± 0,05
<i>E. serpens</i>	369,8 ± 52,6	4,5 ± 0,3	1,46 ± 0,04	0,52 ± 0,04

Valores obtenidos de CFT; CFT; DPPH• y ABTS<sup>•+</sup>.

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó utilizando dos radicales libres: DPPH• y ABTS<sup>•+</sup>. Los resultados obtenidos con el radical DPPH•: los extractos que presentaron mejor actividad fueron *E. serpens* seguido de *P. tenellus*, *P. niruri*; y, por último, *S. haematospermum* (tabla 1). El valor obtenido de IC 50 3,42 mg/ml para *P. niruri* fue mayor a los hallados por Amin *et al.* [32] y Rusmana *et al.* [34]; al igual que *P. tenellus*, cuyo valor obtenido de IC50 3,4 mg/ml fue superior al reportado por Sobreira *et al.* [29]; *S. haematospermum* presentó un IC 50 5,12 mg/ml también superiores a los obtenidos para la especie *S. glandulosum* por Ocampos *et al.* [37]; finalmente, *E. serpens* presentó un IC 50 1,46 mg/ml, mayor que la especie *E. prostrata* informado por Soto-Valenzuela *et al.* [38]. Los resultados obtenidos muestran una inhibición significativa del radical DPPH•, lo que indica la potencial acción reductora de radicales libres de estos extractos. Respecto de la actividad antioxidante por el método ABTS<sup>•+</sup>, las especies *P. niruri* y *P. tenellus* presentaron un IC 50 de 0,72 y 0,71 mg/ml respectivamente, superior a lo informado por Amin *et al.* [32] y Rusmana *et al.* [34], mientras que la especie *E. serpens* mostró un IC 50 0,52 mg/ml, que es menor a lo reportado por Payne *et al.* [39], cuyo valor fue de IC 50 3,92 mg/ml. Por otro lado, el poder reductor es definido como la habilidad de un compuesto para reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, lo cual indica su capacidad de actuar como antioxidante al donar electrones.

Con esta técnica se logró determinar que los extractos con mayor capacidad reductora fueron en orden decreciente: *S. haemastorpermum* > *P. niruri* > *P. tenellus* > *E. serpens* (figura 5). *S. haemastorpermum* presentó un valor superior al reportado por Valdés-Izaguirre *et al.* [40], comparado con otras especies de la misma familia. Analizando los resultados obtenidos es posible afirmar que el poder reductor de los extractos aumenta con el aumento de la concentración fenólica descrito por Yen y Yen [41], Benzie y Szeto [42] y Yildirim *et al.* [43]. A partir de los resultados y datos de la literatura se puede relacionar que los compuestos presentes en los extractos pueden interactuar con la química redox del hierro interfiriendo con el ciclo redox de este metal. Los ensayos realizados sugieren un vínculo entre la acción de los radicales libres y ciertas enfermedades. Uno de los factores etiológicos implicados en el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones es el daño inducido por los radicales libres, quienes provocan la oxidación de las macromoléculas biológicas que no pueden ser contrarrestados por los sistemas de defensa antioxidante del organismo, por lo que sustancias antioxidantes serían beneficiosas ante patologías como infecciones, enfermedades inflamatorias, diabetes, etc. [16].



**Figura 5.** Poder reductor de las distintas especies vegetales.

La formación de los metabolitos secundarios en las especies vegetales está determinada por diferentes factores como suelo, clima, edad de la planta, época de recolección, acondicionamiento y almacenamiento de la misma como también el método de extracción, entre otros; lo que podría explicar la variación de los datos alcanzados en comparación con otros autores. Los resultados obtenidos demuestran que las especies estudiadas

contienen metabolitos de interés terapéuticos (compuestos fenólicos, flavonoides) con propiedades antioxidantes, los cuales son beneficiosos para la salud, y son fuentes promisorias con potencial aplicación con fines medicinales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a la Secretaría de Investigación, Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Chaco Austral.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

1. M.J. Pascual-Villalobos, E. Correal-Castellanos. La familia *Euphorbiaceae* como fuente de aceites vegetales para la industria tecnouímica, *Grasas y Aceites*, **43**(1), 39-44 (1992).
2. L.J. Novara, M.A. Chemisqhy, *Euphorbiaceae Juss*, Flora del valle de Lerma, *Aportes Botánicos de Salta*, **9**(1) 90 p. (2012).
3. *Familia Euphorbiaceae, Eudicotiledónes Escenciales - Clado Rosides-Eurosides I-Malpighiales: Euphorbiaceae*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 2010.
4. J.T. Mwine, P. Van Damme, Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features, *J. Med. Plants Res.*, **5**(5), 652-662 (2011).
5. A.F. Díaz-Eljaiek, *Monografía sobre los conocimientos botánicos de la familia Euphorbiaceae y la especie Croton lechleri*, Monografía botánica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2014.
6. J. Pensiero, J.D. Muñoz, V. Martinez, *Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas*, Argentina Banco Mundial - N° 4085-AR, Alternativas de sustentabilidad del bosque nativo del Espinal, Área Etnobotánica, 2004.
7. E. Alonso-Paz, M. Bassagoda, F. Ferreira, *Yuyos: Uso racional de las plantas medicinales*, Editorial Fin de Siglo, Montevideo, 1992.



8. A.M. Perez de Nucci, *La medicina tradicional del Noroeste argentino: Historia y presente*, Ediciones del Sol, Buenos Aires, 1988, 156 p.
9. E.L. Ratera, M.O. Ratera, *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*, Editorial Hemisferio Popular, Buenos Aires, 1980.
10. The Angiosperm Phylogenetic Group, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II, *Botanic. J. Linnean Soc.*, **141**(4), 399-436 (2003).
11. D.E. Soltis, P.S. Soltis, P.K. Endress, M.W. Chase, *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*, 2nd ed., Oxford University Press, New York, 2005.
12. J.B. Calixto, A.R. Santos, V.C. Filho, R.A. Yunes, Una revisión de las plantas del género *Phyllanthus*: su química, farmacología y potencial terapéutico, *Rev. Inv. Med.*, **18**(4), 225-258 (1998).
13. J. Alonso, C. Desmarchelier, *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud*, Corpus editorial y distribuidora, Buenos Aires, 2015.
14. R.S. Gupta, Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells, *Mol. Microbiol.*, **15**(1), 1-11 (1995).
15. T.M. Sandini, N.M. Rodrigues, K.E. Peli, E. Perez, Avaliação farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb., Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre D'Oeste, Paraná, *Biosaúde*, **13**(1/2), 1-11 (2016).
16. M. Alejandro-Espinosa, X. Jaramillo-Fierro, S. Ojeda-Riascos, O. Malagón-Aviles, J. Ramírez-Robles, Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador, *Bol. Latinoamer, Caribe Plantas Med. Aromát.*, **12**(1), 59-68 (2013).
17. Farmacopea Argentina, 7a edición, Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina, URL: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea\\_Argentina\\_2013\\_Ed.7](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7).
18. H. Wagner, S. Bladt, *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, Springer Science & Business Media, New York, 1996.
19. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.*, **299**, 152-178 (1999).

20. O. Lock, I. Cabello, V.H. Doroteo, *Práctica VI.6: Análisis de flavonoides en plantas*, URL: [https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-6.pdf](https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf).
21. 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).
22. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231-1237 (1999).
23. E.M. Kuskoski, A.G. Asuero, M.C. García-Parilla, A.M. Troncoso, R. Fett, Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos, *Food Sci. Technol. (Campinas)*, **24**(4), 691-693 (2004).
24. M. Oyaizu, Studies on products of browning reaction, *Japan. J. Nutr. Diet.*, **44**(6), 307-315 (1986).
25. J.B. Martínez-Vázquez, *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus**, Tesis de grado, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México, 2007.
26. C.H.T.P da Silva, T.J.S.P. Sobrinho, A.M. Saraiva, M.N.C. Pisciotano, E.L.C. Amorim, Phytochemical profile and antibacterial activity of bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong, *J. Med. Plants Res.*, **6**(32), 4766-4771 (2012).
27. A. Gratti, R. Ricco, A. Gurni, Estudio fitoquímico preliminar en especies patagónicas del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae), *Bol. Latinoamer. Caribe Plantas Med. Aromát.*, **6**(5), 248-249 (2007).
28. J.E. Nascimento, A.F.M. Melo, T.C. Lima, J. Veras Filho, E.M.X Santos, U.P. Albuquerque, E.L.C. Amorim, Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae), *J. Basic Appl. Pharm. Sci.*, **29**(2), 145-150 (2008).
29. G.C. Sobreira, *Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes*, Tesis Doctoral, Universidade de São Paulo, 2016.
30. G. Bagalkotkar, S.R. Saginedu, M.S. Saad, J. Stanslas, Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review, *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**(12), 1559-1570 (2006).

31. C.H. Tabosa-Pereira da Silva, T.J. da Silva-Peixoto Sobrinho, V.T. Nobre de Almeida e Castro, D. da C. Amaral-Lima, E.L. Cavalcanti de Amorim, Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil, *Molecules*, **16**(6), 4728-4739 (2011).
32. Z.A. Amin, M.A. Abdulla, H.M. Ali, M.A. Alshawsh, S.W. Qadir, Assessment of *in vitro* antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*, *J. Sci. Food Agric.*, **92**(9), 1874-1877 (2012).
33. C.A.O. Gualarte, *Avaliação do perfil antioxidante de extratos aquoso e etanólico de Phyllanthus niruri in vitro*, Tesis de grado, Universidade Federal do Pampa, Uru-guaiana, R.G.S., Brasil, 2014.
34. D. Rusmana, R. Wahyudianingsih, M. Elisabeth, B. Balqis, M. Maesaroh, W. Widowati, Antioxidant activity of *Phyllanthus niruri* extract, rutin and quercetin, *Indonesian Biomed. J.*, **9**(2), 84-90 (2017).
35. E.S. Mahdi, A.M. Noor, M.H. Sakeena, G.Z. Abdullah, M. Abdulkarim, M.A. Sattar, Identification of phenolic compounds and assessment of *in vitro* antioxidants activity of 30% ethanolic extracts derived from two *Phyllanthus* species indigenous to Malaysia, *African J. Pharm. Pharmacol.*, **5**(17), 1967-1978 (2011).
36. A.B. Bonilla-Rodríguez, *Estudio Fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de Passiflora manicata*, Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2016.
37. F.M.M. Ocampos, *Estudo fitoquímico, toxicológico e avaliação das atividades biológicas da espécie vegetal Sapium glandulosum (L.) Morong. (Euphorbiaceae)*, Tesis de maestria, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2013.
38. R. Soto-Valenzuela, *Compuestos activos con capacidad hipoglucemiante en Cnidoscolus chayamansa (chaya), Euphorbia prostrata (hierba de la golondrina) y Jatropha dioica (sangre de drago)*, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014.
39. A. Payne, A.K. Mukhopadhyay, S. Deka, L. Saikia, S.P. Nandi, Anti-vibrio and antioxidant properties of two weeds: *Euphorbia serpens* and *Amaranthus viridis*, *Res. J. Med. Plants*, **9**, 170-178 (2015).

40. L.E. Valdés-Izaguirre, Q. Arias-Cedeño, J. Ramírez-Arzuaga, D. Peña-Fuentes, Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de extractos etanólicos de *Jatropha aethiopica* Müell Arg var *inermis*, *Rev. Cubana Quím.*, **30**(3), 440-453 (2018).
41. G.C. Yen, H.Y. Chen, Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agric. Food Chem.*, **43**(1) 27-32 (1995).
42. I.F.F. Benzie, Y.T Szeto, Capacidad antioxidante total de los tés mediante el ensayo de reducción de hierro / poder antioxidante, *Rev. Quím. Agríc. Aliment.*, **47**(2), 633-636 (1999).
43. A. Yildirim, A. Mavi, A.A. Kara, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **49**(8), 4083-4089 (2001).

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.S. Soro, G.M. Valenzuela, M.B. Núñez, Actividad antioxidante de cuatros especies vegetales del nordeste argentino, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 236-252 (2021).

## Caracterização físico-química, fitoquímica e avaliação da eficácia antimicrobiana de um gargarejo fitoterápico

Laura Christina Freitas<sup>1</sup>, Ana Laura de Cabral Sobreira<sup>2</sup>, Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>3</sup>, Egberto Santos Carmo<sup>4</sup>, Júlia Beatriz Pereira de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brasil. Correio eletrônico: lauracfreitas93@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brasil, Correio eletrônico: lauracabralas@gmail.com

<sup>3</sup> Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brasil, Correio eletrônico: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

<sup>4</sup> Prof. Dr. Universidade Federal de Campina Grande, 58429-900, Cuité, Paraíba, Brasil. Correio eletrônico: egberto\_santos@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Prof. Dra. Universidade Federal de Campina Grande, 58429-900, Cuité, Paraíba, Brasil. Correio eletrônico: juliabtriz@gmail.com

Recebido: 31 de julho de 2020

Revisado: 15 de dezembro de 2020

Aceto: 18 de dezembro de 2020

### RESUMO

**Objetivo:** considerando a importância dos produtos naturais de uso tradicional, o trabalho propôs a avaliação de parâmetros de qualidade e atividade antimicrobiana *in vitro* do gargarejo produzido no Centro de Educação Popular (Cenep), Nova Palmeira (PB), e utilizado para o tratamento de afecções da orofaringe e amígdalas. **Metodologia:** três amostras de gargarejo foram analisadas para avaliar o aspecto microbiológico sendo realizada a contagem de micro-organismos viáveis, por semeadura em profundidade. **Materiais e métodos:** a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. pyogenes* foi realizada utilizando o método de difusão em ágar e os parâmetros físico-químicos determinados foram pH, resíduo seco, densidade, bem como a caracterização fitoquímica. **Resultados:** apresentaram contagem microbiana dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia. A atividade antimicrobiana contra *S. pyogenes* apresentou halos de inibição variando de 10,5 a 18,6 mm para

amostra diluída e pura, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos apresentaram pH  $4,39 \pm 0,16$ ; o resíduo seco de 13,4 % a 15,4 %; e a densidade de  $1,013 \pm 0,010$ . O perfil fitoquímico foi caracterizado pela presença de taninos, alcaloides e flavonoides. **Conclusões:** o gargarejo apresentou-se adequado para uso, tendo em vista os parâmetros microbiológicos, físico-químicos, fitoquímicos apresentados, bem como a comprovação da eficácia antimicrobiana adequada ao uso terapêutico proposto.

*Palavras chave:* Fitoterapia, controle de qualidade, faringoamigdalite.

## SUMMARY

### Physico-chemical characterization, phytochemistry and evaluation of the antimicrobial efficacy of an herbal medicine gargle

**Aim:** considering the importance of natural products of traditional use, the work proposed the evaluation of quality parameters and *in vitro* antimicrobial activity of the gargle produced at the Popular Education Center (Cenep), Nova Palmeira (PB), and used for the treatment of oropharynx and tonsil disorders. **Methodology:** Three gargle samples were analyzed, in order to evaluate the microbiological aspect, the count of viable microorganisms was performed, by pour plate method. **Materials and methods:** The evaluation of antimicrobial activity *in vitro* against *S. pyogenes* was performed using the agar diffusion method and the physicochemical parameters determined were pH, dry residue, density, as well as phytochemical characterization. **Results:** They had microbial counts within the limits established by the pharmacopoeia. The antimicrobial activity against *S. pyogenes* had inhibition halos ranging from 10.5 to 18.6 mm for diluted and pure samples, respectively. The physical-chemical parameters showed pH  $4.39 \pm 0.16$ ; the dry residue of  $14.43 \pm 1.00$ ; and the density of  $1.013 \pm 0.010$ . The phytochemical profile was characterized by the presence of tannins, alkaloids and flavonoids. **Conclusion:** Thus, the gargle was suitable for use, considering the microbiological, physical-chemical, phytochemical parameters presented, as well as the proof of antimicrobial efficacy suitable for the proposed therapeutic use.

*Keywords:* Phytotherapy, quality control, pharyngotonsillitis.

## RESUMEN

### Caracterización fisicoquímica, fitoquímica y evaluación de la eficacia antimicrobiana de unas gárgaras de hierbas medicinales

**Objetivo:** considerando la importancia de los productos naturales de uso tradicional, el trabajo propuso la evaluación de los parámetros de calidad y la actividad antimicrobiana *in vitro* de la gárgaras producidas en el Centro de Educación Popular (Cenep), Nova Palmeira (PB), y utilizadas para el tratamiento de los trastornos de la orofaringe y las amígdalas. **Metodología:** se analizaron tres muestras de gárgaras para evaluar el aspecto microbiológico, se realizó el recuento de microorganismos viables, sembrando en profundidad. **Materiales y métodos:** la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. pyogenes* se hizo mediante el método de difusión en agar y los parámetros fisicoquímicos determinados fueron pH, residuo seco, densidad, así como caracterización fitoquímica. **Resultados:** hubo recuentos microbianos dentro de los límites establecidos por la Farmacopea. La actividad antimicrobiana contra *S. pyogenes* tenía halos de inhibición que oscilaban entre 10,5 y 18,6 mm para muestras diluidas y puras, respectivamente. Los parámetros fisicoquímicos mostraron un pH que oscila entre  $4,39 \pm 0,16$ ; el residuo seco del  $14,43 \pm 1,00$ ; y la densidad de  $1,013 \pm 0,010$ . El perfil fitoquímico se caracterizó por la presencia de taninos, alcaloides y flavonoides. **Conclusión:** por lo tanto, la gárgara demostró ser adecuada para su uso, considerando los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, fitoquímicos presentados, así como la prueba de la eficacia antimicrobiana adecuada para el uso terapéutico propuesto.

*Palabras clave:* Fitoterapia, control de calidad, faringoamigdalitis.

## INTRODUÇÃO

A faringoamigdalite caracteriza-se pela colonização das amígdalas e orofaringe por uma gama de micro-organismos que inclui bactérias e vírus. Porém, uma constante preocupação médica são as infecções causadas pelo *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria  $\beta$ -hemolítica do grupo A de Lancefield, que é potencialmente capaz de causar complicações em órgãos vitais [1, 2].

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, utilizados

com frequência pelos efeitos benéficos que produzem, apesar de não terem todos seus constituintes químicos conhecidos [3]. Grande parte da população que procura nos remédios caseiros a cura para sua enfermidade recorre aos raizeiros/curandeiros das suas regiões para tal fim.

O Centro de Educação Popular (Cenep), organização não-governamental localizada no município de Nova Palmeira (PB), desenvolve a prática do uso de remédios caseiros. Nessa instituição são utilizadas várias plantas do bioma caatinga, e além dos remédios naturais, também são oferecidas terapias complementares.

Gargarejo é um produto utilizado por agitação de infuso, decocto ou maceração na garganta pelo ar que se expela da laringe, não devendo o líquido ser engolido ao final [4]. É uma das principais alternativas caseiras e complementares no combate a afecções da garganta, que podem ser bastante eficazes sem oferecer muito risco aos usuários. Existem vários produtos que podem ser associados nas preparações de gargarejo, inclusive, mistura de plantas medicinais que vão fornecer ação antibacteriana, anti-inflamatória e analgésica.

Em estudo realizado por Oliveira *et al.* [5], 27 plantas utilizadas na forma de gargarejo para tratamento de afecções bucais foram mencionadas. Alencar *et al.* [6] destacou em seu estudo a utilização da casca de romã na forma de gargarejo do macerado e chá para o tratamento de afecções como, gengivite e faringite. A *Punica granatum* além de possuir uma abundância de flavonóides, antocianinas, catequinas e derivados elágicos hidrolisáveis específicos, são ricas também em lignanas [7].

Entretanto, assim como qualquer outro medicamento, aqueles baseados em plantas devem comprovar sua eficácia e segurança para uso, exigindo que procedimentos de controle de qualidade sejam estabelecidos em toda a sua cadeia produtiva, desde o seu plantio até a droga vegetal ou fitoterápico, prontos para dispensação [8].

Tendo em vista a grande incidência de infecções nas vias aéreas superiores, e o uso de produtos naturais para o seu tratamento, o trabalho se justifica na investigação da atividade antimicrobiana de um produto tradicional a base de plantas utilizadas sobre essas infecções do trato respiratório, além de demonstrar a presença dos compostos fitoquímicos responsáveis por essa atividade, e também na comparação da eficácia com produtos já estabelecidos no mercado, utilizados para o mesmo fim. Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de qualidade e a eficácia antimicrobiana *in vitro* do gargarejo produzido na Oficina de Remédios Caseiros do Cenep.



## MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Controle da Qualidade e de Microbiologia do Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, no Centro de Educação e Saúde, Cuité (PB).

Foram analisadas três amostras (A, B e C) do gargarejo à base de associação de plantas medicinais (romã, gengibre e tansagem) provenientes da Oficina de Remédios Caseiros do Cenep.

### Avaliação microbiológica

A contagem de micro-organismos viáveis foi realizada através do método de semeadura em profundidade, a partir de diluições em série de 1:10, 1:100 e 1:1000 conforme descrito na Farmacopeia Brasileira [9]. Foi utilizado Ágar Caseína-Soja (ACS), incubado à 35°C por 5 dias e Ágar *Sabouraud* Dextrose (ASD) à 25°C por 7 dias, para a contagem de bactérias e fungos, respectivamente.

Os patógenos pesquisados foram *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, conforme estabelecido na Farmacopeia Brasileira para produtos de preparação para uso tópico (oromucosa e gengival), utilizando ágar manitol salgado e ágar cetrimida, seguido de provas bioquímicas específicas [9].

Todos os meios utilizados eram da marca Kasvi® e os sais utilizados para a preparação de soluções e reagentes da marca Dinâmica®.

Para a identificação dos fungos filamentosos foi utilizada a técnica de microcultivo. Após incubação, os fungos provenientes do crescimento, foram analisados macroscopicamente operando um microscópio óptico com objetiva de 40x.

### Comprovação do potencial antimicrobiano do gargarejo contra *S. pyogenes*

Para a realização dos testes de comprovação da eficácia antimicrobiana do gargarejo, foi utilizado o método de difusão em ágar. Para isto, usou-se uma cepa de *Streptococcus pyogenes* proveniente de isolado clínico e fornecida pelo laboratório de microbiologia clínica da mesma instituição. O inóculo foi preparado a partir de um repique recente em ágar nutriente inclinado e incubado por 24 h, seguido de suspensão em solução salina 0,9% e padronização a 25% de transmitância, com densidade microbiana de aproximadamente  $0,5 \times 10^8$  UFC/mL.

O método de difusão em ágar [9] consistiu, inicialmente, na preparação de uma camada base de meio ágar nutriente a 50°C e distribuídos sobre as placas de Petri uniformemente

em uma superfície nivelada, e posteriormente adicionada à camada semeada com 2% de suspensão padronizada de *S. pyogenes*.

Em seguida, dispôs-se quatro cilindros de aço inoxidável em cada placa de Petri adequadamente para que não houvesse sobreposição dos halos. Em cada cilindro foi adicionado um tipo de solução diferente, sendo o gargarejo puro (Gp), o gargarejo diluído (Gd) de acordo com as instruções de uso estabelecidas pelo Cenep, e os outros dois cilindros com produtos já estabelecidos no mercado, um antisséptico (C1) composto por hortelã, aroeira, eucalipto e romã, e um Colutório (C2) composto por aroma de menta, álcool e outros constituintes.

O procedimento foi realizado utilizando-se cinco placas para cada amostra (A, B e C). Os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro e documentados de acordo com as amostras utilizadas na placa de Petri.

#### Controle de qualidade físico-químico

Foram realizados ensaios para determinação de pH, resíduo seco, densidade e características organolépticas, conforme especificações da Farmacopeia Brasileira [9].

#### Caracterização fitoquímica

Inicialmente 10 mL do gargarejo foi diluído em 25 mL de água, conforme a orientação de uso. Foram utilizados quatro tubos de ensaio para a detecção, sendo o primeiro referente à pesquisa de alcaloides, dois para taninos, um para flavonoides e um branco. Cada tubo de ensaio continha 2 mL da solução obtida do gargarejo seguido da adição dos reagentes necessários para identificação de cada grupo metabólito secundário (tabela 1). A evidenciação foi realizada conforme especificações da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, sendo a mudança na coloração ou turvação da solução, o indicativo da presença dos compostos ativos.

**Tabela 1.** Triagem fitoquímica realizada com o gargarejo.

Metabólitos secundários	Testes de triagem	Reação
Flavonoides	Reação de Shinoda	Mudança de coloração
Alcaloides	Reagente de Dragendorff	Formação de precipitado
Taninos	Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ); gelatina 2%	Mudança de coloração turvação

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do levantamento bibliográfico sobre as plantas que compõem o gargarejo estão ilustrados no tabela 2, os quais descreveram diferentes constituintes responsáveis pelas atividades terapêuticas.

**Tabela 2.** Informações das plantas medicinais contidas no gargarejo.

Nome popular	Nome científico	Metabólitos secundários	Uso etnofarmacológico	Referência
Romã	<i>Punica granatum</i>	Taninos, flavonoides, alcaloides	Doenças inflamatórias e infecciosas	[10]
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Alcaloides, antraquinonas	Anti-inflamatório, antiemético, antibiótico	[10, 11]
Tansagem	<i>Plantato major</i>	Taninos, flavonoides, alcaloides	Afecções de boca e garganta	[4, 10]

Muitos trabalhos científicos pesquisaram as propriedades medicinais da romãzeira (*P. granatum*). No entanto, ainda não há estudos etnofarmacológicos, farmacognósticos e toxicológicos suficientes para elucidar os mecanismos de ação e efeitos dos constituintes químicos derivados da romã. Somente recentemente observou-se que a punicalagina, um tanino elágico extraído do fruto da romanzeira, é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos deste fruto [12].

Popularmente, o gengibre vem sendo empregado por meio de soluções e sprays, na cavidade oral, devido a sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Pesquisas mostram que óleos e extratos de *Z. officinale* apresentam ação inibitória sobre bactérias Gram-positivas e negativas, porém ainda há poucos estudos que relacionam o gengibre aos micro-organismos prevalentes na cavidade bucal, visto que esta apresenta uma microbiota bastante variada e que pode desencadear inúmeras patologias [13].

*Plantago major* é utilizada tradicionalmente para múltiplas enfermidades, variando de acordo com a parte da planta utilizada. As folhas são usadas como antissépticas, depurativas, hemostáticas, antibacterianas, supurativas, diuréticas, desinfetantes, anti-inflamatórias, antipiréticas, entre outras [14].

### Contagem de micro-organismos viáveis

Pode-se observar crescimento bacteriano e fúngico em todas as amostras de gargarejo, embora não tenha sido observada em todas as diluições utilizadas. Os resultados obtidos após contagem dos micro-organismos estão ilustrados na tabela 3. Os níveis de micro-organismos aeróbios mesófilos viáveis totais encontrados variaram de  $2,0 \times 10^1$  a  $3,7 \times 10^2$  para fungos e  $1,0 \times 10^2$  a  $1,6 \times 10^3$  para bactérias.

**Tabela 3.** Contagem de micro-organismos viáveis nas amostras de gargarejo.

Amostras	Fungos (UFC/mL)	Bactérias (UFC/mL)
A	$2,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^3$
B	$5,5 \times 10^1$	$6,0 \times 10^2$
C	$3,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$

Fonte: Dados da pesquisa.

As preparações de uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo e auricular), devem apresentar contagem total de bactérias aeróbias menor que  $10^2$  UFC/mL e menor que  $10^1$  UFC/mL para fungos [15]. Houve crescimento bacteriano e fúngico em todas as amostras do gargarejo, porém, para produtos de origem vegetal para uso oral, a farmacopeia estabelece o limite microbiano para bactérias aeróbias menor que  $10^4$  UFC/mL e menor que  $10^2$  UFC/mL para fungos. Por se tratar de um produto de origem natural, o gargarejo estudado se enquadrou dentro dos limites estabelecidos.

Os produtos comercializados, incluindo os fabricados a base de plantas medicinais, estão sujeitos à presença de variados tipos de contaminantes, sendo a contaminação microbiológica de importância significativa na medicina, pois pode oferecer riscos potenciais à saúde dos usuários. Em função da origem da planta, diversos tipos de micro-organismos podem estar presentes, desde bactérias até fungos, tendo como possíveis fontes de contaminação a poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e estocagem das matérias primas vegetais [16].

### Pesquisa de patógenos

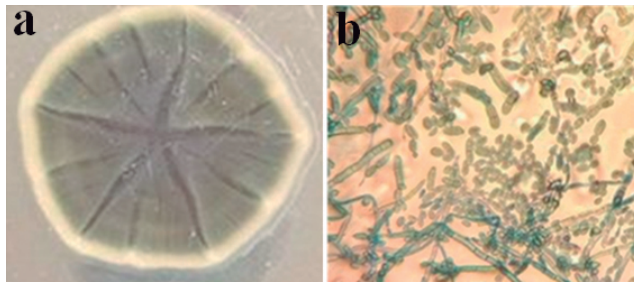
No rastreamento de *S. aureus* utilizando o meio manitol salgado, foi possível observar a formação de colônias amareladas características para esse tipo de micro-organismo nas três amostras (A, B e C). Porém, a confirmação da presença desse micro-organismo foi negada através da realização do teste de DNase.

Na pesquisa da presença de *Pseudomonas aeruginosa* em ágar cetrimida, observou-se que não houve formação da presença de pigmento azulado em nenhuma das amostras com

crescimento bacteriano, comprovando a ausência desse micro-organismo nas amostras do produto.

A farmacopeia apenas estabelece que para produtos de uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular), devem ter contagem total de fungos/leveduras inferior a  $10^1$  UFC/mL. Embora não haja exigências quanto à identificação de fungos de acordo com o que é estabelecido na Farmacopeia Brasileira [9], os fungos foram identificados macroscopicamente e microscopicamente.

Macroscopicamente, nas amostras de gargarejo, as colônias apresentaram-se veludas, penugentas e superfície áspera, topografia elevada e colorações que variaram de cinza-esverdeado ao cinza-claro, marrom-esverdeado e negro (figura 1a). Microscopicamente, as colônias apresentaram-se com coloração marrom escuro, característico de fungos demáceos, organizados com aspecto de cachos em cadeia ramificadas e apresentando hifas finas, septadas, ramificadas, e forma de “galhos de árvore” (figura 1b). Essas características são compatíveis com os fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* [11]. Desta forma, todas as amostras de gargarejo apresentaram contaminação fúngica pelo fungo citado.



**Figura 1.** Características macromorfológicas. A. micromorfológicas. B.40x do crescimento de fungos nas amostras de gargarejo.

O gênero *Cladosporium* spp., identificado como contaminante das amostras de gargarejo, é um dos fungos de maior concentração no ar, particularmente em regiões quentes, como no Seridó da Paraíba [17]. *Cladosporium* spp. são fungos filamentosos, caracterizados por apresentarem uma coloração escura. São fungos saprófitos, normalmente encontrado em plantas colonizadoras ou no solo [18]. Embora não seja relatado que espécies de *Cladosporium* produzam micotoxinas de grande preocupação, é válido ressaltar que são fungos produtores de compostos orgânicos voláteis associados com odores que alteram as características organolépticas [19]. Há relatos que o gênero *Cladosporium* spp. ocorre sobre inúmeras espécies vegetais, especialmente como componente da microflora das sementes, ainda no campo e durante a estocagem e armazenamento [20].

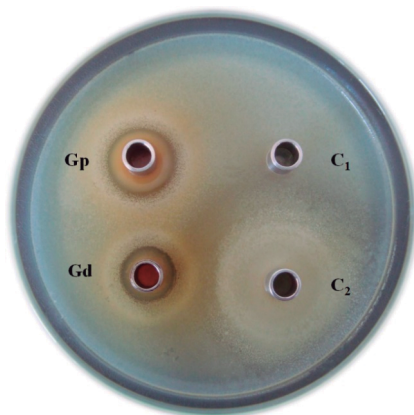
### Verificação do potencial antimicrobiano do gargarejo

As médias dos diâmetros dos halos de inibição das amostras de gargarejo variaram de 15,4 a 18,6 mm na forma de gargarejo puro, e 10,5 a 14,0 mm na sua forma diluída (tabela 4).

**Tabela 4.** Diâmetro dos halos de inibição bacteriana (mm) do gargarejo na sua forma pura e diluída apresentados em valores médios e desvio padrão (n=5).

Amostra	Diâmetro dos halos (mm)	
	Gargarejo puro mmédia ± DP	Gargarejo diluído (2:5) média ± DP
A	15,4 ± 0,52	10,5 ± 0,54
B	16,2 ± 1,60	11,2 ± 0,80
C	18,6 ± 0,09	14,0 ± 1,54

Todas as amostras de gargarejo apresentaram halos de inibição frente ao *Streptococcus pyogenes* variando de 15,4 a 18,6 mm quando puras e 10,5 a 14,0 quando diluídas, destacando-se a amostra C com os melhores resultados. No entanto, os produtos comerciais avaliados, caracterizados como antisséptico (C1) e colutório (C2), não apresentaram halo de inibição contra o micro-organismo testado conforme observado da figura 2.



**Figura 2.** Teste de eficácia antimicrobiana frente à *Streptococcus pyogenes*. Gp: gargarejo puro; Gd: gargarejo diluído 2:5; C1 e C2: produtos comerciais para afecções da garganta.

Pereira *et al.* [21] também demonstraram a eficácia do extrato da romã sobre outras espécies de *Streptococcus*, são elas: *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *Lactoba-*

*cillus casei*, tendo-se observado halos de inibição que variaram de 10 a 25 mm, e sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 15 mm.

### Controle de qualidade físico-químico

As amostras de gargarejo apresentaram aspecto de suspensão, com precipitado castanho-esverdeado, conforme observado no tubo 5 da figura 3a. Odor e sabor característicos das plantas utilizadas na sua composição.

As amostras de gargarejo apresentaram pH de  $4,39 \pm 0,16$ , resíduo seco médio  $14,43 \pm 1,00$  e densidade média de  $1,013 \pm 0,010$  (tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados obtidos após controle de qualidade físico-químico da amostra de gargarejo.

Amostra	Parâmetro		
	pH	Resíduo seco (%)	Densidade (g/mL)
A	4,48	14,50	1,005
B	4,48	13,40	1,004
C	4,21	15,40	1,030
Média $\pm$ DP	$4,39 \pm 0,16$	$14,43 \pm 1,00$	$1,013 \pm 0,010$

Fonte: dados da pesquisa.

A amostra C apresentou maior porcentagem de resíduo seco (15,40 %), fato que pode justificar a obtenção dos maiores halos de inibição sobre o *Streptococcus pyogenes* corroborando a indicação da maior eficácia antimicrobiana como consequência da presença de uma maior quantidade de extrativos vegetais.

É importante ressaltar que a variação de pH de uma formulação pode modificar as características físico-químicas dos ativos veiculados, influenciando atributos relacionados a estabilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade, comprometendo a segurança e eficácia terapêutica da formulação [22].

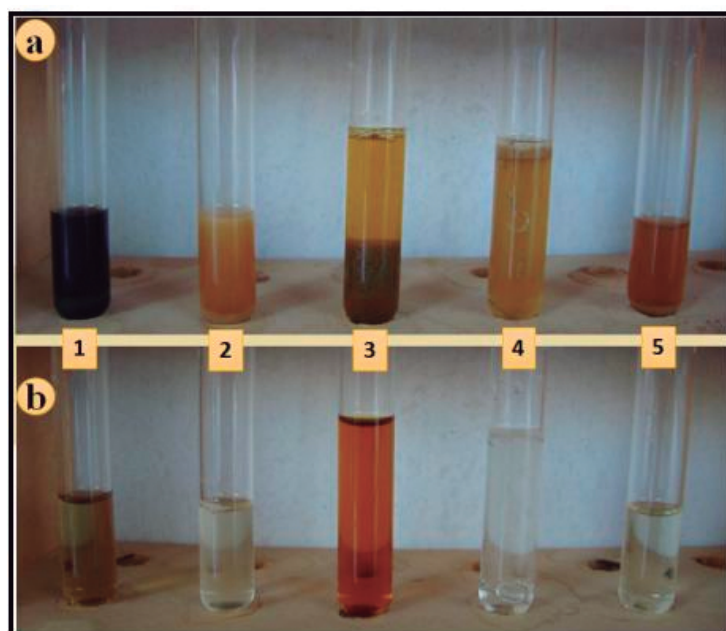
Estudos destacam que todos os parâmetros físico-químicos (pH, resíduo seco e densidade) podem afetar a segurança e eficácia do produto e causar prejuízos ao consumidor especialmente porque fitoterápicos, na sua grande maioria, são produtos cuja venda independe de prescrição médica [23].

### Triagem fitoquímica

Todos os testes realizados para comprovação da presença de metabólitos secundários tiveram resultados positivos (Tabela 6). Os testes aplicados para comprovação da presença de grupos de metabólitos secundários nas amostras A, B e C, demonstraram através de reações intensas, presença de taninos, flavonoides e alcaloides (figura 3a). Contudo, quando aplicados à uma amostra comercial, com composição vegetal semelhante às amostras de gargarejo, apresentam reação negativa para a presença de flavonoides e reação fraca quanto à presença de taninos e alcaloides (figura 3b).

**Tabela 6.** Triagem fitoquímica.

Metabólitos secundários	A	B	C
Flavonoides	+	+	+
Alcaloides	+	+	+
Taninos	+	+	+



**Figura 3.** Identificação de presença de grupos de substâncias fitoquímicas características. A. Gargarejo Cenep. B. Produto comercial. Testes para taninos: 1 e 2: cloreto férrico e gelatina; 3: alcaloides; 4: flavonoides; 5: branco.



A romã (*Punica granatum* Linn.) é basicamente composta por taninos (substâncias polifenólicas) e alcaloides que são substâncias dotadas de ação antimicrobiana [24].

Em relação à composição do gengibre, em um estudo que analisou o perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre, foram detectados a presença de polifenóis através do doseamento em espectrofotômetro, porém em pequenas concentrações [25].

Em um estudo da análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal, confirmaram a presença de alcaloides e flavonoides para a espécie *Plantago major* (Tanchagem) [26]. Um estudo comprovou que as folhas do *P. major* L. apresentaram um perfil fitoquímico composto por flavonoides, taninos, saponinas, terpenos, glicosídeos e alcaloides.

Os resultados obtidos após análise fitoquímica do gargarejo, corroboram os dados encontrados na literatura em relação à sua composição. Esses compostos são os responsáveis pela eficácia do gargarejo no combate às afecções da garganta.

O presente estudo expõe resultados inéditos, apresentando fitoquímica qualitativa, além de realizar uma associação do uso popular com a comprovação experimental da eficácia, ainda que *in vitro*, do gargarejo fitoterápico. Havendo necessidade de realizar testes *in vivo* nos próximos estudos.

## CONCLUSÃO

O gargarejo produzido na Oficina de Remédios Caseiros do Ceneq (Nova Palmeira), apresentou parâmetros de qualidade adequados do ponto de vista microbiológico e físico-químico, com um perfil fitoquímico composto por taninos, alcaloides e flavonoides, corroborando dados encontrados na literatura em relação à composição das plantas medicinais utilizadas na sua preparação, bem como, mostrou-se adequado do ponto de vista da indicação terapêutica popular, tendo em vista que o mesmo demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. pyogenes*, um dos micro-organismos responsáveis pela faringoamigdalite, sendo mais eficaz em inibir o micro-organismo quando comparado aos produtos disponíveis no mercado utilizados neste trabalho. Este estudo fortalece a valorização e a preservação do conhecimento popular, em especial para a população de Nova Palmeira, que entre tantas regiões também faz uso desse recurso terapêutico alternativo com segurança, eficácia e qualidade.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Z.N. Julie, R.Z. Arivelo, R.D. Hendriso, A. Ramamonjisoa, R. Andry, Current practice about the evaluation of antibody to streptolysin O (ASTO) levels by physicians working in Antananarivo, Madagascar, *African Health Sciences*, **14**, 384 (2014).
2. G.E.C. Bernarde, B. Wingert, G. Pereira, Como diagnosticar e tratar amigdalites: tonsillitis, *Rev. Bras. Med.*, **67**, 352-358 (2010).
3. J.K. Abat, S. Kumar, A. Mohanty, Ethnomedicinal, phytochemical and ethnopharmacological aspects of four medicinal plants of Malvaceae used in Indian traditional medicines: a review, *Medicines*, **4**, 75 (2017).
4. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, *Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos*, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília -DF, 2014.
5. E.O.D.S, Oliveira, K.F.S. Collier, G.M.F. Mota, B.P. Ely, F.R. Pereira, Plantas medicinais usadas pela comunidade Kalunga do quilombo do Engenho de Dentro em Cavalcante–GO para tratamento de afecções bucais, *Revista Cereus*, **4**, 11 (2010).
6. M.Y.A. Alencar, D.A. Costa, J.B.P. Souza, M.C.B. Alencar, E.S. Carmo, Investigação etnobotânica das plantas medicinais utilizadas para o tratamento de faringoamigdalite no CRAS de Cuité, PB, *Rev. Verde Agroecol. Desenvol. Sustent.*, **10**(1), 170-177 (2015).
7. F. Bonzanini, R. Bruni, G. Palla, N. Serlataite, A. Caligiani, Identification and distribution of lignans in *Punica granatum* L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC–MS, *Food Chem.*, **117**(4), 745-749 (2009).
8. T.M. Souza-Moreira, H.R.N. Salgado, R.C.L.R. Pietro, O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **20**, 435-440 (2010).

9. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, V. 1, 6<sup>o</sup> ed., Brasília: Fiocruz, 2019, URL: <http://portal.anvisa.gov.br>, Acesso em: 28 de julho de 2020.
10. E.G. Alves, A.H.C Vinholis, L.A. Casemiro, N.A.J.C. Furtado, M.L.A Silva, W.R. Cunha, C.H.G Martins, Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, *Quím. Nova*, **31**, 1224-1229 (2008).
11. P.L. Palatty, R. Haniadka, B. Valder, R. Arora, M.S Baliga, Ginger in the prevention of nausea and vomiting: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **53**, 659-669 (2013).
12. T.C. Silva, A.L. de S. Amâncio-Zara, F.A. da Silva-Sá, *et al.*, Antifungal potential of punicalagin against *Cryptococcus neoformans* species complex. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **60**, e60, 6 p. (2018).
13. R.O.N.B. Medeiros, *Estudo da aplicação na área da saúde do gengibre, sua caracterização química*, Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Granja, Portugal, 2017, p. 68.
14. Brasil, Ministério da Saúde, *Monografia da Espécie Plantago major L. (Tanchagem)*, Brasília, 2014.
15. R.W. Riddell, Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture, *Mycologia*, **2**, 265-270 (1950).
16. L.S.A.T. Takahashi, J.R Souza, A.E. Yoshida, J.N. Rocha, Condições de armazenamento e tempo de embebição na germinação de sementes de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), *Rev. Bras. Plantas Med.*, **11**, 1-6 (2009).
17. B.C.A. Zoppas, R.M. Valencia-Barrera, G.D. Fernández, Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp. no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo, *Rev. Bras. Alergia Imunopatol.*, **34**, 55-58 (2011).
18. INSHT. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, *Cladosporium* spp. 2014, URL <https://www.insst.es/resultados-busqueda-textual?q=cladosporium&search=search#gsc.tab=0&gsc.q=cladosporium&gsc.page=1>, acesso em 29 de Julho de 2020.
19. S. Rivas, C.M. Thomas, Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*, *Rev. Phytopathol.*, **43**, 395-436 (2005).

20. M. Goldfarb, M.E.M. Duarte, M.E.R.M.C. Mata, L.C. Nascimento, N.M. Brito, F.M. Souto, Incidência de fungos e qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) após o armazenamento criogênico, *Rev. Biotemas*, **23**, 19-26 (2010).
21. J.V. Pereira, M.S. Vieira-Pereira, F.C. Sampaio, M.C. Correia-Sampaio, P.M. Alves, C.R. Ferreira de Araújo, J.S. Higino, Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre micro-organismos do biofilme dental. *Rev. Bras. Farmacog.*, **16**, 88-93 (2006).
22. C. Bugnotto, G. Soares, L.V. Laporta, M.P. Alves, C.A. Schmidt, J.B. Limberger, Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo própolis, *Disciplinarum Scientia Saúde*, **7**, 1-12 (2016).
23. G.D. Ferreira, A.L.C. Sobreira, M.A. Mattos, F.D. Medeiros, J.B.P. Souza, Tintura de mulungu (*Erythrina velutina*): preparo e caracterização de parâmetros de qualidade, *J. Biol. Pharm. Agric. Manag.*, **17**(1), 20-37 (2021).
24. B. Singh, J.P. Singh, A. Kaur, N. Singh, Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review, *Food Chem.*, **261**, 75-78 (2018).
25. M.L. Rodrigues, R.K. Lira, Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* roscoe), *Rev. Saúde Biol.*, **8**, 44-52 (2013).
26. C.H.G. Cordeiro, L.V.S. Sacramento, M.A. Corrêa, A.C. Pizzolito, T.M. Bauabm, Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, **42**, 395-404 (2006).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

L.C. Freitas, A.L. de Cabral-Sobreira, F.P. de Andrade Júnior, E. Santos-Carmo, J.B. Pereira de Souza, Caracterização físico-química, fitoquímica e avaliação da eficácia antimicrobiana de um gargarejo fitoterápico, *Rev. Colomb. Ciênc. Quím. Farm.*, **50**(1), 253-268 (2021).

## Food nitrates and nitrites as possible causes of cancer: A review

Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>1</sup>, Ana Laura Sobreira de Cabral<sup>1</sup>, Januse Míllia Dantas de Araújo<sup>2\*</sup>, Laísa Vilar Cordeiro<sup>1</sup>, Marília de Barros Cândido<sup>2</sup>, Alison Pontes da Silva<sup>2</sup>, Brenda Tamires de Medeiros Lima<sup>2</sup>, Bruna Braga Dantas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Paraíba, Health Sciences Center, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

<sup>2</sup> Federal University of Campina Grande (UFCG), Education and Health Center (CES), Cuité, Paraíba, Brazil.

<sup>3</sup> Ph. D. Professor at Federal University of Campina Grande (UFCG), Education and Health Center (CES), Cuité, Paraíba, Brazil.

\*Corresponding author: janusemillia96@gmail.com

Received: 2 October 2020

Revised: 14 December 2020

Accepted: 18 December 2020

### SUMMARY

**Introduction:** Nitrates and nitrites can be found in meat and dairy products, vegetables, and fruits. The consumption of these preservatives has been associated with the emergence of gastric, colorectal cancer and non-Hodgkin's lymphoma, although studies are still inconclusive. **Methodology:** It is a review of literature of the narrative type, in which there was a recovery of articles published in English and Portuguese, in the databases SciELO, Lilacs, Science Direct and Capes journals. Articles related to nitrates and nitrites in foods were included, as well as articles that correlated the consumption of these preservatives with the appearance of cancers, regardless of the year of publication, although articles published between the years 2009 to 2019 were prioritized. **Results:** Nitrates and nitrites are generally associated with industrialized food products; therefore, it is possible to observe the presence of these salts in a wide variety of foods. The excessive consumption of nitrates and nitrites, whether through water or food, has been associated with a great diversity of diseases, stimulating the development of several studies investigating, including, the correlation between the consumption of these preservatives and the appearance of cancers. **Conclusion:** it is observed that nitrates and nitrites form compounds with a carcinogenic potential, making them interesting to avoid excessive consumption of these preservatives.

*Key words:* Preservative, carcinogenesis, nitrate, nitrite.

## RESUMEN

### Nitratos y nitratos alimentarios como posibles causas de cáncer: una revisión

**Introducción:** los nitratos y nitritos pueden ser encontrados en carnes y productos lácteos, verduras y frutas. El consumo de estos conservantes ha sido asociado con la aparición de cáncer gástrico, colorrectal y linfoma no Hodgkin, aunque los estudios aún no son concluyentes. **Metodología:** se hizo una revisión de tipo narrativo de la literatura, en la que se recuperaron artículos publicados en inglés y portugués, en las bases de datos SciELO, Lilacs, Science Direct y revistas Capes. Se incluyeron artículos relacionados con nitratos y nitritos en alimentos, así como artículos que correlacionaban el consumo de estos conservantes con la aparición de cánceres, independientemente del año de publicación, aunque se priorizaron artículos publicados entre los años 2009 a 2019. **Resultados:** los nitratos y nitritos se asocian generalmente con productos alimenticios industrializados; por tanto, es posible observar la presencia de estas sales en una amplia variedad de alimentos. El consumo excesivo de nitratos y nitritos, ya sea a través del agua o de los alimentos, se ha asociado a una gran diversidad de enfermedades, estimulando el desarrollo de varios estudios que investigan, entre ellos, la correlación entre el consumo de estos conservantes y la aparición de cánceres. **Conclusión:** así, se observa que los nitratos y nitritos, forman compuestos con potencial carcinogénico, por lo que resulta interesante evitar el consumo excesivo de estos conservantes.

*Palabras clave:* Conservantes, carcinogénesis, nitratos, nitritos.

## RESUMO

### Nitratos e nitratos dietéticos como possíveis causas de câncer: uma revisão

**Introdução:** nitratos e nitritos podem ser encontrados em carnes e laticínios, vegetais e frutas. O consumo desses conservantes tem sido associado ao desenvolvimento de câncer gástrico e colorretal e linfoma não Hodgkin, embora os estudos ainda não sejam conclusivos. **Metodologia:** trata-se de uma revisão de literatura do tipo narrativa, na qual houve a recuperação de artigos publicados em inglês

e português, nas bases de dados SciELO, Lilacs, Science Direct e Periódicos Capes. Foram incluídos artigos relacionados a nitratos e nitritos em alimentos, bem como artigos que correlacionassem o consumo desses conservantes com o aparecimento de cânceres, independentemente do ano de publicação, embora tenham sido priorizados os artigos publicados entre os anos de 2009 a 2019. **Resultados:** nitratos e nitritos são geralmente associados a produtos alimentícios industrializados; portanto, é possível observar a presença desses sais em uma grande variedade de alimentos. O consumo excessivo de nitratos e nitritos, seja pela água ou pelos alimentos, tem sido associado a uma grande diversidade de doenças, estimulando o desenvolvimento de diversos estudos que investiguem, inclusive, a correlação entre o consumo desses conservantes e o aparecimento de cânceres. **Conclusão:** assim, observa-se que nitratos e nitritos formam compostos com potencial carcinogênico, por isso é interessante evitar o consumo excessivo desses conservantes.

*Palavras-chave:* Conservantes, carcinogênese, nitratos, nitritos.

## INTRODUCTION

Food additives can be defined as substances, such as dyes, antioxidants, thickeners, stabilizers, and preservatives, intentionally added to industrial products in order to provide greater safety and validity to them [1].

Among the innumerable preservatives, nitrates and nitrites are curing salts, used in the preservation of industrial foods, whose intention is to maintain the integrity of the product, that is, to act to delay or inhibit microbial degradation and/or enzymatic degradation of food. These substances also have functionality in terms of color fixing and influencing flavor and aroma, characteristic of cured foods [2].

Nitrates and nitrites are preservatives whose primary activity is the inhibitory action of *Clostridium botulinum*, a pathogenic bacterium with a high toxic content, capable of inducing foodborne infections in humans, through the production of neurotoxins related to botulism. However, it is important to emphasize that nitrate directly do not have a potential blocker of this bacterium and its reduction to nitrite is essential for this activity [3].

In terms of conservation, these compounds are of great importance for the technological area of food. On the other hand, their intake is controversial as to their harmful effects on human health, especially in relation to the development and progression of cancers [4].

Cancer is the term used to refer to a complex set of distinct and non-communicable diseases, which is characterized by the uncontrolled growth of cells in the most diverse tissues of the body. Once these cancer cells move from one tissue to another, there is the formation of metastasis [5].

It is believed that the carcinogenic potential of nitrates, nitrites, and their derivatives, is related to the ability to damage molecules of deoxyribonucleic acid (DNA) and may contribute to the process of illness with the emergence of diseases such as cancer [6]. However, it is complicated to talk about reducing the levels of preservatives at an industrial level, since the shelf life of food products and their acceptable storage time are also reduced proportionally [7].

Although preservatives have indisputable benefits, the routine use of nitrite and nitrate salts is questionable and worrisome. Thus, the present study aimed to investigate the relationship between the consumption of nitrates and nitrites and the appearance of cancers.

## METHODOLOGY

It is a review of literature of the narrative type, in which there was a recovery of articles published in English and Portuguese, in the databases SciELO, Lilacs, Science Direct and Capes journals. Articles related to nitrates and nitrites in foods were included, as well as articles that correlated the consumption of these preservatives with the appearance of cancers, regardless of the year of publication, although articles published between the years 2009 to 2019 were prioritized. In addition, works that could not be accessed in full were immediately excluded from the study.

## RESULTS

Nitrates and nitrites are generally associated with industrialized food products; therefore, it is possible to observe the presence of these salts in a wide variety of foods (table 1).

In view of the information described in the table above, it is possible to observe that both meat and processed foods, as well as fruits and vegetables have nitrates and nitrites in their composition, in the most different countries.

It is important to highlight that the concentration of nitrite and nitrate can vary between the samples analyzed, according to the origin (country/region/factory).



**Table 1.** Concentration of nitrates and nitrites in different foods.

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Chetty and Prasad [8]	Fiji	Foods based on fruits, vegetables, dairy, and food processed.	These figures are below the level recommended by European Union legislation ( $\leq 150$ mg/mL).	The average content of nitrates and nitrites measured was 48.66 and 1.28 mg/kg, respectively. Limit of detection: Nitrate 1.0-20.0 $\mu$ g/mL. Nitrite 0.025-2.0 $\mu$ g/mL.
Abdulkair, Elzupir and Alamer [9]	Saudi Arabia	Processed meats	With the exception of one sample, the results obtained are within the limits established in the Saudi Arabian legislation, which recommends maximum concentrations of nitrates and nitrites equivalent to 125 mg/kg.	Nitrite concentrations ranged from 1.78 to 129.69 mg/kg. The concentrations of nitrates found ranged from 0.76 to 96.64 mg/kg. Limit of detection: Nitrate 27.4 ng/mL - 91.4 ng/mL. Nitrite 0.0006 ng/mL - 0.002 ng/mL.
Genualdi <i>et al.</i> [10]	United States	Cheese	The results are lower than that recommended by the general standard for food additives (GSFA).	64 samples of cheese, concentrations ranged from below the method detection limit (MDL) to 26 mg/kg for nitrates and no concentrations of nitrites were found in any of the cheese samples above the MDL of 0.1 mg/kg.

Table 1. (Continuation).

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Dos Santos Baiao <i>et al.</i> [11]	Brazil	Beetroot	*	The nitrate content of Brazilian samples ranged from 5.74 mmol/L to 17.1 mmol/L, which was lower than that obtained in North American samples, which had a content of 31.2 mmol/L. As for the nitrite content, the North American samples again had higher concentrations, with a value of 0.45 mmol/L, while the content in the Brazilian samples varied from 0.04 to 0.13 mmol/L. Among the beets purchased in Brazil, samples from Rio de Janeiro and Rio Grande do Norte obtained the highest concentrations of nitrates and nitrites, respectively. The limit of detection for $\text{NO}_2^-$ and $\text{NO}_3^-$ was of $1.0 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ .
Silalahi <i>et al.</i> [12]	Indonesia	Vegetables	*	The influence of temperature and storage time on the levels of nitrates and nitrites in lettuce was evaluated. At room temperature, the initial concentrations of nitrates and nitrites, which were 6.07 and 22.63 mg/kg, respectively, increased after 48 hours to 70.83 and 48.14 mg/kg, respectively. At a temperature of 10 °C, the initial levels of nitrates and nitrites, which were equivalent to 3.06 and 21.89 mg/kg, respectively, increased after 48 hours to 64.42 and 40.08 mg/kg. Thus, the study showed that higher temperatures and longer storage periods favor increased levels of nitrates and nitrites. Detection limits are not specified.
Adami <i>et al.</i> [13]	Brazil	Processed meats	Brazilian legislation	A total of 33 samples were analyzed, sending that 30.3% had nitrite values above the allowable by Brazilian legislation (150 mg/kg), while 69.7% had nitrate values higher than those acceptable in Brazil (300 mg/kg). Detection limits are not specified

Table 1. (Continuation).

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Sousa <i>et al.</i> [14]	Brazil	Processed meats	Brazilian legislation.	Calabrian sausages from four different manufacturers (A, B, C, D) were evaluated and it can be seen that the sample concentrations ranged from 105.0 mg/kg to 122.0 mg/kg and 234.0 mg/kg to 245.0 mg/kg for nitrite and nitrate, respectively. Analyzing the levels of nitrite and nitrate separately, it was noted that in all brands evaluated the quantities obtained obeyed the levels proposed by the legislation (150 mg/kg for nitrite and 300 mg/kg for nitrate). Detection limits are not specified.
Oliveira <i>et al.</i> [15]	Brazil	Processed meats	Brazilian legislation	A total of 270 sausage samples from three different manufacturers each were analyzed. The presence of nitrite was in all samples of the meat products analyzed, whose average concentrations ranged from 29.25 ppm to 249.80 ppm. Sausages from manufacturers A and C had a nitrite content higher than that allowed by Brazilian legislation (maximum 150 ppm). Among the sausages and mortadella, all the samples analyzed showed nitrite levels within the parameters recommended by legislation. Detection limits are not specified.
Makki and Ziarati [16]	Iran	Tomato products	World Health Organization legislation	The nitrate level analyzed in fresh tomato fruits showed an average of $12.55 \pm 0.002$ (mg/kg $\pm$ S.E). Tomato juice obtained the lowest average in the level of nitrate with $6.77 \pm 0.002$ (mg/kg $\pm$ S.E). Ketchup showed the highest average nitrate concentration, with $65.73 \pm 0.007$ (mg/kg $\pm$ S.E). The results of nitrite in the studied samples showed different trend, the tomato fruit had an average nitrite concentration of $0.21 \pm 0.001$ (mg/kg $\pm$ S.E), and the highest average level of nitrite was found in tomato juice with $0.28 \pm 0.001$ (mg/kg $\pm$ S.E), while ketchup sauce had the lowest average nitrite content with $0.10 \pm 0.001$ (mg/kg $\pm$ S.E). Detection limits are not specified.

Table 1. (Continuation).

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Alexander <i>et al.</i> , [17]	Nigeria	Vegetables	World Health Organization legislation	The average level of nitrates was higher in spinach ( $52.50 \pm 4.00$ mg/kg at $53.50 \pm 4.50$ mg/kg), amaranth ( $43.50 \pm 3.50$ mg/kg at $47.50 \pm 2.50$ mg/kg), okra ( $39.00 \pm 2.10$ mg/kg at $40.50 \pm 0.90$ mg/kg) and onion ( $37.50 \pm 0.40$ mg/kg at $39.00 \pm 1.60$ mg/kg), intermediate in tomato ( $34.50 \pm 2.40$ mg/kg at $36.50 \pm 2.40$ mg/kg) and lower in cabbage ( $15.00 \pm 1.60$ mg/kg at $20.50 \pm 1.50$ mg/kg), with nitrate levels in these vegetables being below the WHO standard limit. The nitrite concentration in the different vegetables studied exceeded $1.0$ mg/kg, but it is within the limit allowed by the WHO standard limit, and the values do not show a significant difference between most vegetables. Detection limits are not specified.
Perufo and Hoehne [18]	Brazil	Processed meat	World Health Organization legislation	A total of 5 legalized agribusinesses were evaluated and all samples of colonial type salami showed residual levels of sodium nitrite ( $<5.0$ ppm) and sodium nitrate ( $71.70$ ppm at $146.00$ ppm), below the recommended by current legislation. Still, of the 5 irregular manufacturers evaluated, only 1 (20%), was inadequate with residual sodium nitrate value (336 ppm), above the values established by current legislation. Detection limits are not specified.
Hengtes <i>et al.</i> [19]	Brazil	Processed meat	Brazilian legislation	The study aimed to determine the levels of nitrite and nitrate in sausages sold in a region of southern Brazil, comparing the levels between different brands. The results of the study indicated that a value less than half of the samples (29), represented by the percentage of 40.3%, presented nitrite concentrations above the content established by the legislation, while half of the samples (36), represented by the percentage of 50%, and presented nitrate concentrations above the established content. Detection limits are not specified.

Table 1. (Continuation).

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Faria <i>et al.</i> [20]	Brazil	Processed meat	Brazilian legislation	In the results of the study, it was observed that the analyzed samples had an average concentration of nitrite of $140.48 \pm 0.77$ mg/kg after manufacture, therefore being in compliance with the maximum limit established and allowed by Brazilian legislation (150 mg/kg). Detection limits are not specified.
Bahadoran <i>et al.</i> [21]	Iran	Vegetables, fruits, grains, dairy, meat and processed foods	*	Relatively high levels of nitrate were observed in breads (0.50 mg/g). The averages of nitrate and nitrite in fruits ranged from 0.07 to 0.47 mg/g and 0.15-0.71 mg/100 g, respectively. The vegetables that had the highest nitrate concentrations were included radish (6.3 mg/g), beet (4.9 mg/g), tarragon (4.2 mg/g), lettuce (3.6 mg/g), mint (2.8 mg/g) and celery (2.6 mg/g). Nitrite concentrations in vegetables ranged from 0.21 to 0.74 mg/100 g. In dairy products, the average nitrite and nitrate content ranged from 0.14-0.45 mg/100 g to 0.01-0.06 mg/g. The average concentrations of nitrate and nitrite in meat and processed products ranged from 0.05 to 0.19 mg/g and 2.93-13.9 mg/100 g, respectively. Limit of detection was 0.006 mg/g and 0.10 mg/100 g, for nitrate and nitrite.
Laia <i>et al.</i> [22]	Portugal	Vegetables and fruits	Portuguese legislation	In the referred study, the nitrate content in 17 samples was analyzed. The nitrate concentration of the analyzed samples varied between the values of 11 and 2369 mg/kg of product. The horticultural product that showed a higher level than the maximum level established by the legislation was lettuce. The nitrate content in all samples was below the maximum allowed limits (2500 to 4500 mg/kg).

**Table 1.** (Continuation).

Author (s) and Year	Country	Food (s)	Source of legislation	Range of found concentration /Detection limit
Ding <i>et al.</i> [23]	United States	Fruits and vegetables	*	131 samples of fermented and acidified vegetable products were analyzed from batches of 46 products available for sale. In the analyzes, nitrite was detected in low concentrations (<1.5 mg/100 g) in four acidified products, including pickled green beans, red cabbage, pickled beets and pickled mushrooms and in two fermented products, in Greek olives and kimchi. Nitrate concentrations showed variations from an average value of 122 mg/100 g for kimchi to levels not detectable in acidified Brussels sprouts. The limit of detection for nitrite was 0.5 mg/L.
Scheibler, Marchi and Souza [24]	Brazil	Processed meat	Brazilian legislation	Nitrate and nitrite concentrations were higher than allowed (80 mg/kg). Detection limits are not specified.

\*The study does not cite consulted legislation source; Source: Research data, 2019.

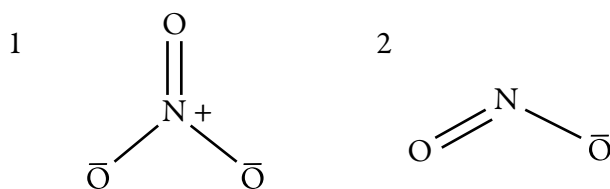
In addition, the storage time and temperature itself can contribute to the increase in the content of these preservatives, indicating that the longer the product takes to be consumed, the richer in nitrates and nitrites it can become [12].

Nitrites are mainly associated with meat products, requiring a minimum of 20 mg  $\text{NaNO}_2$  /kg of product, while nitrates are mostly found in vegetables, corresponding to 70% of the intake of this ion in the human diet, in which is believed to vary between 100 to 200 mg in a conventional diet [2, 25, 26].

Thus, it is important to note that, especially in meat products, the uses of these preservatives are essential to allow the protection of these products against *C. botulinum*. On the other hand, in fruits and vegetables, their concentrations are influenced by the climate, soil and use of fertilizers. Therefore, there is moderation in the consumption of these foods, especially the industrialized ones that present higher levels of these and other preservatives [2, 12].

### Reactions involving nitrates and nitrites after ingestion

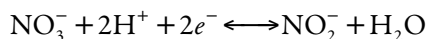
The chemical structures of the nitrate and nitrite ions can be seen below (figure 1).



**Figure 1.** Chemical structure of nitrate (1) and nitrite (2) ions.

These ions can be found in organic and inorganic form. The organic ones are more complex from the structural point of view, being obtained in a synthetic way, while the inorganic ones are structurally simpler and occur naturally [27].

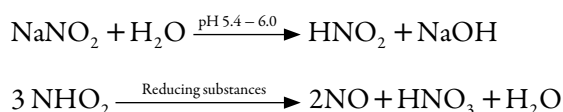
In the human organism, these compounds appear endogenously (biosynthesis process) and exogenously (water and food) [27, 28]. After ingesting the food or water containing these preservatives, regardless of concentration, there is a natural reaction of reduction by bacterial enzymes (nitrates reductases) and there is a biotransformation of nitrate ( $\text{NO}_3$ ) into nitrite ( $\text{NO}_2$ ) (equation 1).



**Reaction 1.** Biotransformation from nitrate to nitrite by reducing bacteria.

Although nitrate is moderately stable, but nitrite is extremely reactive and this characteristic allows an easy formation of N-nitrous compounds (carcinogens), such as N-nitrosodimethylamine and monomethylnitrosamine, which are about ten times more toxic than nitrates [28-30].

Nitrite is converted into nitrous acid, in the presence of favorable reducing conditions for carrying out the reaction, in which the nitrous acid is reduced to nitric oxide. It is possible to observe the reactions that happen (figure 2), which are potentiated by the acidic pH of the stomach [27, 29].



**Figure 2.** Formation of nitrous acid (1) and nitric oxide (2).

### The consumption of nitrates and nitrites and the appearance of cancers

The excessive consumption of nitrates and nitrites, whether through water or food, has been associated with a great diversity of diseases, stimulating the development of several studies investigating, including, the correlation between the consumption of these preservatives and the appearance of cancers (table 2).

Since 1992, studies have linked the consumption of nitrates and nitrites to cancer. It is known that cancer is a set of several neoplasms that can originate in any part of the body, having a multifactorial cause. In this perspective, the studies analyzed the relationship between the consumption of healing salts and the development of a variety of neoplasms and it was possible to observe that a direct association of the intake of these preservatives and the emergence of non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer, rectal cancer, and prostate cancer. However, some researchers have failed to prove this relationship [31-42]. This contradiction can be influenced by numerous factors, considering that the development of type of cancers can be related to several other population factors, such as age, gender, genetic predisposition, eating habits and lifestyle associated with smoking and consumption of alcohol, disregarding the rules and inspection of each country regarding the presence of these salts in the water and food offered to the population.

In studies in which correlations or an increased likelihood of neoplasms were observed, it was noted that gastric cancer has been the most cited of all, which is a worrying finding, since it is considered the sixth most common cancer in world and the third



**Table 2.** Conclusions about the consumption of water and foods rich in nitrates and nitrites and the appearance of cancers, from studies published between 1992 and 2017.

Author and year	Food type	Sample size	Article title	Cancer type and conclusions
Gulis, Czompoljova and Cerhan [31]	Water	197 854 individuals. 96341 men and 101513 women.	An ecologic study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Trnava District, Slovakia.	Non-Hodgkin's lymphoma and incidence of colorectal cancer was observed among men and women exposed to water containing high concentrations of nitrates (> 20 mg/L).
Jensen [32]	Water	1113 individuals. The study did not differ between the sexes of the participants.	Nitrate in drinking water and cancer in northern Jutland, Denmark, with special reference to stomach cancer.	It was observed that the consumption of nitrate seems to be weakly associated with the development of gastric cancer, believing that nitrate is only one of the several factors associated with gastric cancer.
Knekt <i>et al.</i> [33]	Cured meats and sausages, and vegetables, and beer	9985 individuals. 5274 men, 4711 women.	Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study.	There was no correlation between nitrite consumption and the incidence of tumors in the stomach and intestine.
Law <i>et al.</i> [34]	Water	20702 individuals. The study did not differ between the sexes of the participants.	Non-Hodgkin's lymphoma and nitrate in drinking water: a study in Yorkshire, United Kingdom.	No association was found between the consumption of high concentrations of nitrate and bladder and kidney cancers, however it seemed to contribute to the appearance of non-Hodgkin's lymphoma.

**Table 2.** (Continuation).

Author and year	Food type	Sample size	Article title	Cancer type and conclusions
Yang, Wu and Chang [35]	Water	2234 individuals. 1310 men and 924 women.	Nitrate in drinking water and risk of death from colon cancer in Taiwan.	There is no correlation between water consumption and colon cancer.
Zhu <i>et al.</i> [36]	Beer, pickled vegetables, and meats.	4241 individuals, 2291 men and 1, 950 women.	Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada.	Ingestion of N-nitrosous compounds was associated with an increased risk of developing colorectal cancer, specifically for rectal carcinoma.
Loh <i>et al.</i> [37]	Meat	3268 individuals with cancer. 1 671 men and 1 597 women.	N-nitroso compounds and cancer incidence: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Norfolk study.	The diet rich in N-nitrosous compounds is correlated with an increased risk of rectal cancer.
Morales-Suarez-Varela, <i>et al.</i> , [38]	Water	*	Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain.	There was a correlation between the consumption of water containing nitrates (> 25 mg/L) and the increased mortality from gastric and prostate cancer.
Palli <i>et al.</i> [39]	Various foods	24 patients. 15 men and 9 women.	O6-alkylguanines, dietary N-nitroso compounds, and their precursors in gastric cancer.	Association between gastric cancer and elevated dietary nitrate intake.

Table 2. (Continuation).

Author and year	Food type	Sample size	Article title	Cancer type and conclusions
Song, Wu and Guan [40]	*	*	Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis.	Nitrites have been associated with an increased risk of gastric cancer.
Van Loon <i>et al.</i> [41]	Vegetables, water, and meat	282 members of the cohort (219 men and 63 women) and 3123 members of the subcohort (1525 men and 1598 women).	Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study.	There was no correlation between the levels of nitrate ingested and stomach cancer.
Taneja <i>et al.</i> [42]	Water and vegetables	234 individuals, of whom 78 had gastric cancer (47 men and 31 women) and 156 were in the control group (110 men and 46 women).	The risk of cancer as a result of elevated levels of nitrate in drinking water and vegetables in Central India.	Indicated that the intake of >45 mg/L nitrate via drinking water produced an additional Gastric Cancer risk.

\* No data.

with the highest mortality rate [43, 44]. High mortality is associated with the fact that gastric cancer is usually silent, causing those affected to show signs and symptoms when the tumor is already quite developed. In these stages there is, for example, weight loss, constipation, vomiting and, in more advanced clinical situations, there is the presence of a palpable tumor mass [45]. A systematic review with meta-analysis, carried out on stomach cancer, showed that there is a statistically significant association between the high or moderate consumption of nitrates and the appearance of this type of cancer [46].

Colorectal cancer, in turn, covers tumors in the regions of the large intestine, mainly involving the colon, rectum and anus. Those affected usually have abdominal pain, bleeding in the stools, weight loss, anemia, and abdominal mass (tumor) [47], while non-Hodgkin's lymphoma is a type of cancer that originates in the lymphatic system, arising when a lymphocyte turns into a malignant cell, with the presence of water, fevers, night sweats, pruritus, and weight loss [48].

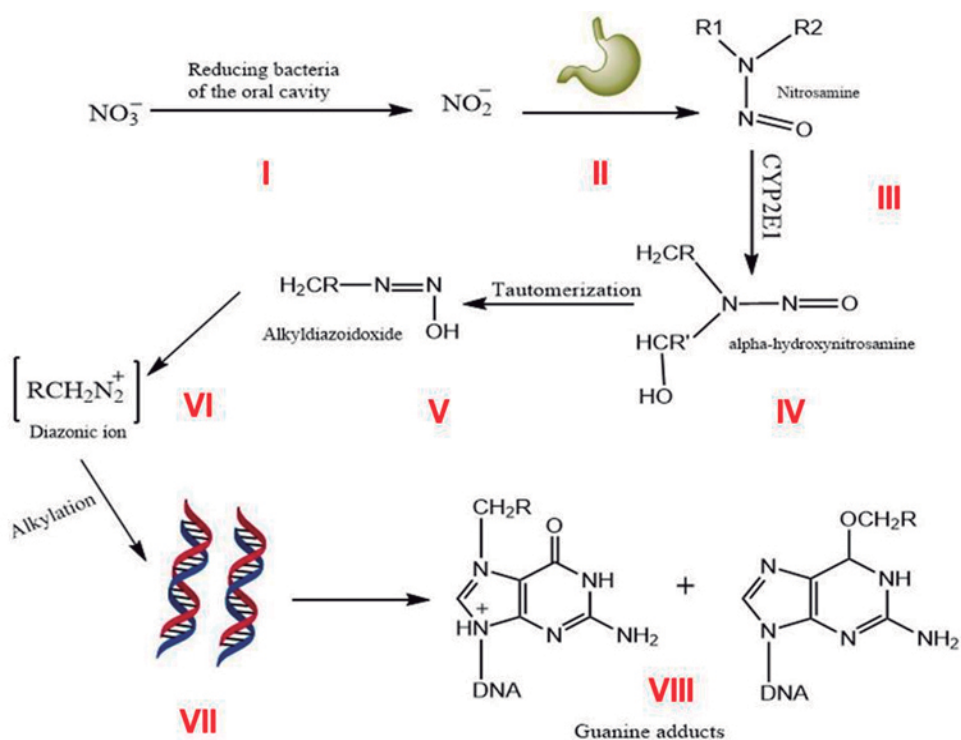
All cancers evidenced in the studies that are correlated with the consumption of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ , can arise due to the excessive consumption of industrialized foods such as sausage, sausage, ham, bologna, salami, among others. In addition, it is important to highlight that, as already mentioned in this study, these foods are rich in nitrates and nitrites and in several studies, they present concentrations above those allowed by the laws of different countries, with the possibility of consuming foods rich in these preservatives, be directly related to the appearance of neoplasms [47].

In studies that observe a high consumption of nitrites and nitrites, there is a higher prevalence for the appearance of cancers when compared to populations where there is no consumption of such compounds. This finding has been proven in the laboratory through the quantification of nitrates in the urine and saliva of individuals affected by different types of cancers [49].

However, even though it is not completely clear, the general concern with prolonged exposure to nitrite and nitrate is due to the formation of nitrosamines, which are extremely carcinogenic nitrogen compounds [50]. In addition, it is important to show that nitrate is naturally eliminated from the body through urine and saliva, however nitrite tends to accumulate and contribute to the formation of N-nitrous compounds [51].

Nitrates are bioconverted to nitrites by reducing bacteria in the oral cavity, leading to increased production of free radicals. In addition, in the stomach, these nitrites are bioconverted to nitrosamines that are widely absorbed by the gastrointestinal tract, which can cause injury to several cells. Nitrosamines, once they come into contact with

different cells from different tissues, can react with the DNA molecule, promoting the formation of adducts. But, for this, those compounds that do not undergo bioaccumulation need to be metabolized. Biotransformation starts from the hydroxylation of the carbon of the alkyl group, with the enzyme CYP2E1, as the main catalyst. Thus, there is the formation of an aldehyde or ketone and a primary nitrosamine, which tautomerizes to an alkyldiazohydroxide that can give rise to a diazonic ion, which takes up nucleophilic sites of DNA and RNA, with the formation of adducts and causing possible mutations (figure 3) [26, 51, 52, 53].



**Figure 3.** Mechanisms of adduct formation after ingesting nitrates and nitrites. I. Nitrates are bioconverted to nitrites, by reducing bacteria, in the oral cavity. II. In the stomach, nitrites are bioconverted to nitrosamines. III. Nitrosamines undergo hydroxylation of the carbon of the alkyl group, with the enzyme CYP2E1 as the main catalyst. IV. There is formation of an aldehyde or ketone and a primary nitrosamine. V. Occurs tautomerization to an alkyldiazohydroxide. VI. Diazonic ion is formed. VII. The diazonic ion alkylates DNA nucleophilic sites. VIII. Adduct formation and possible mutations.

Another evidence that supports the hypothesis that these compounds are carcinogenic is the appearance of micronuclei in lymphocytes from individuals who excrete these nitrogen compounds in the urine. The presence of a micronucleus, by itself, indicates mutations and an increased risk of cancer [54].

In addition, nitrosamines, which can originate through nitrates and nitrites, have been classified in group 2A for toxic substances, indicating that there is indeed evidence of their carcinogenic potential in humans and rodents. Furthermore, the toxicity of nitrates and nitrites occurs differently for each person, since age, nutritional and immune status, environment, and frequency of ingestion of certain foods, may be associated with the appearance of cancers [2, 26, 53].

## CONCLUSION

Nitrates and nitrites are important for the conservation and improvement of organoleptic characteristics in various foods, and can be found in meat products, dairy products, fruits, and vegetables. For this reason, it is relevant to emphasize that it is already well documented in the literature that these compounds, when biotransformed, have a carcinogenic potential, so that it becomes interesting to avoid excessive consumption of these food inputs.

However, the different studies are still contradictory in relation to the results expressed. Thus, there is a lack of epidemiological studies that can characterize different populations and different neoplasms in relation to the consumption of these healing salts, making the data present in this research can be used to encourage the emergence of new research on this topic.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. M.A. Coimbra, B.B. Oliveira, F. Poças, A. Teixeira, I. Delgadillo, Aditivos e contaminantes da cadeia alimentar: enquadramento legal, progressos relevantes e riscos emergentes (Riscos e Alimentos), *Conselho Científico da ASAE*, **14**, 36-43 (2017).

2. L.Z. Iamarino, M.C. Oliveira, M.M. Antunes, M. Oliveira, R.O. Rodrigues, C.I.C.B. Zanin, M. Schimile, A.A. Lima, Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos, *Gestão Foco*, **7**, 246-251 (2015).
3. A. Fratucci, L. Silva, M.D.C.S. Guedes, Nitratos, nitritos e n-nitrosaminas: efeitos no organismo, *Revista Eletrônica FACP*, **6**(11), 41-55 (2017).
4. R. Olivo, L.G.T. Ribeiro, New concepts on nitrates and nitrites, *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, **24**, 115-125 (2018).
5. Brasil, Ministério da Saúde, *Câncer: o que é, causas, tipos, sintomas, tratamentos, causas e prevenção*, 2019. URL: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>, consultado em: 20 dez. 2019.
6. F.S. Ferreira, Aditivos alimentares e suas reações adversas no consumo infantil, *Rev. Univ. Vale do Rio Verde*, **13**, 397-407 (2015).
7. L. Rodrigues, *Exigência do consumidor perante a indústria de alimentos: Revisão de literatura*, Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2019, pp. 1-25.
8. A.A. Chetty, S. Prasad, Flow injection analysis of nitrate and nitrite in commercial baby foods, *Food Chem.*, **197**, 503-508 (2016).
9. B.Y. Abdulkair, A.O. Elzupir, A.S. Alamer, An ultrasound assessed extraction combined with ion-pair HPLC method and risk assessment of nitrite and nitrate in cured meat, *J. Anal. Methods Chem.*, **2018**, ID 1907151, 1-6 (2018).
10. S. Genualdi, N. Jeong, L. Dejager, Determination of endogenous concentrations of nitrites and nitrates in different types of cheese in the United States: method development and validation using ion chromatography, *Food Addit. Contamin.: Part A*, **35**, 615-623 (2018).
11. D. dos Santos-Baião, C.A. Conte-Junior, V.M.F. Paschoalin, T.S. Alvares, Quantitative and comparative contents of nitrate and nitrite in *Beta vulgaris* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence, *Food Anal. Methods*, **9**, 1002-1008 (2016).
12. J. Silalahi, A.F. Nasution, N. Ginting, Y.C. Silalahi, The effect of storage condition on nitrite and nitrate content in lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Int. J. Pharm-Tech Res.*, **9**, 422-427 (2016).

13. F.S. Adami, L.S. Giovanaz, G. Altenhofen, S.M. dal Bosco, A. Marcadenti, E.C. Oliveira, Análise microbiológica e de nitrito e nitrato em linguiça, *Scientia Plena*, **11**, 1-7 (2015).
14. V.S.C. Sousa, L.H.G.M. Lima, S.A. Teixeira, B.V.S. Cardoso, Quantificação de nitrato e nitrito utilizados em linguiças tipo calabresa comercializadas em Picos-PI, *Rev. Intertox, Toxicol. Risco Amb. Soc.*, **9**, 55-67 (2016).
15. J.F. Oliveira, U.R. Silva, V.A.A. Pastore, E.C. Azevedo, G.M. Campos, F.C.G. Silva, F. Raghianti, O.A. Martins, Determinação espectrofotométrica de nitrito em produtos cárneos embutidos, *Rev. Bras. Hig. Sanid. Animal*, **11**, 19-31 (2017).
16. F.M. Makki, P. Ziariti, Nitrate and nitrite in fresh tomatoes and tomato products, *Biomed. Pharmacol. J.*, **8**, 115-122 (2015).
17. P. Alexander, P. Handawa, U.T. Charles, Determination of nitrate and nitrite contents of some edible vegetables in Guyuk Local Government Area of Adamawa State, Nigeria, *Amer. Chem. Sci. Int. J.*, **13**(3), 1-7 (2016).
18. N.B. Perufo, L. Hoehne, Análise de sais de cura em salames tipo colonial comercializados na Serra do Rio Grande do Sul, *Rev. Destaq. Acadêm.*, **7**, 193-201 (2015).
19. D. Hentges, N. Zart, L.G. Marmitt, E.C. Oliveira, F.S. Adami, Concentrações de nitrito e nitrato em salsichas, *Rev. Bras. Promoç. Saúde*, **29**, 27-33 (2016).
20. G.H.F. Faria, A.F. Moreno, M.F.A. Silveira, R.M. Geraldine, D.M. Carvalho, Avaliação do teor de nitrito em apresuntados armazenados em diferentes temperaturas, *Rev. Proc. Quím.*, **10**, 281-285 (2016).
21. Z. Bahadoran, P. Mirmiran, S. Jeddi, F. Azizi, A. Ghasemi, F. Hadaegh, Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats, *J. Food Comp. Anal.*, **51**, 93-105 (2016).
22. R. Laia, A. Rebelo, C. Serra, E. Vasco, Teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos consumidos ao longo do ano em Portugal, *Bol. Epidemiol.*, **7**, 21-24 (2018).
23. Z. Ding, S. D. Johanningsmeier, R. Price, R. Reynolds, V.-D. Truong, S.C. Payton, F. Breidt, Evaluation of nitrate and nitrite contents in pickled fruit and vegetable products, *Food Control*, **90**, 304-311 (2018).



24. J.R. Scheibler, M.I. Marchi, C.F.V. Souza, Análise dos teores de nitritos e nitratos de embutidos produzidos em municípios do Vale do Taquari-RS, *Rev. Destaq. Acadêm.*, **5**, 201-207 (2013).
25. F.M.C. Ganhão, *Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2011, p. 1-111.
26. C.M.J. Benevides, M.V. Souza, R.D.B. Souza, M.V. Lopes, Fatores antinutricionais em alimentos: revisão, *Segurança Alimentar e Nutricional*, **18**, 67-79 (2011).
27. ATSDR, *ATSDR Case Studies in environmental Medicine -Nitrate/Nitrite toxicity*, Department of Health and Human Services -Agency for toxic substances and disease registry, 2013, pp. 1-90.
28. S.A. Omar, E. Artime, A.J. Webb, A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites, *Nitric Oxide*, **26**, 229-240 (2012).
29. N.S. Bryan, J.L. Ivy, Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients, *Nutrit. Res.*, **35**, 643-654 (2015).
30. K.O. Honikel, The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Sci.*, **78**, 68-76 (2008).
31. G. Gulis, M. Czompolyova, J.R. Cerhan, An ecologic study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Trnava District, Slovakia, *Environm. Res.*, **88**, 182-187 (2002).
32. O.M. Jensen, Nitrate in drinking water and cancer in northern Jutland, Denmark, with special reference to stomach cancer, *Ecotoxicol. Environm. Safety*, **6**, 258-267 (1982).
33. P. Knekt, R. Jarvinen, J. Dich, T. Hakulinen, Risk of colorectal and other gastrointestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and Nnitroso compounds: a follow-up study, *Int. J. Cancer*, **80**, 852-856 (1999).
34. G. Law, R. Parslow, P. McKinney, R. Cartwright, Non-Hodgkin's lymphoma and nitrate in drinking water: a study in Yorkshire, United Kingdom, *J. Epidemiol. Commun. Health*, **53**, 383-384 (1999).
35. C.Y. Yang, D.C Wu, C.C. Chang, Nitrate in drinking water and risk of death from colon cancer in Taiwan, *Environm. Int.*, **33**, 649-653 (2007).

36. Y. Zhu, P.P. Wang, J. Zhao, R. Green, Z. Sun, B. Roebbothan, J. Squires, S. Buehler, E. Dicks, J. Zhao, M. Cotterchio, P.T. Campbell, M. Jain, P.S. Parfrey, J.R. McLaughlin, Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada, *Brit. J. Nutr.*, **28**, 1109-1117 (2014).
37. Y.H. Loh, P. Jakszyn, R.N. Luben, A.A. Mulligan, P.N. Mitrou, K.T. Khaw, N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Norfolk study, *Amer. J. Clin. Nutr.*, **93**, 1053-1061 (2011).
38. M.M. Morales-Suarez-Varela, A. Llopis-Gonzalez, M L. Tejerizo-Perez, Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain, *Eur. J. Epidemiol.*, **11**, 15-21 (1995).
39. D. Palli, C. Saieva, C. Coppi, G. del Giudice, C. Magagnotti, G. Nesi, F. Orsi, L. Aioldi, O6-alkylguanines, dietary N-nitroso compounds, and their precursors in gastric cancer, *Nutrit. Cancer*, **39**, 42-49 (2001).
40. P. Song, L. Wu, W. Guan, Dietary nitrates, nitrites and nitrosamines intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis, *Nutrients*, **7**, 9872-9895 (2015).
41. A.J. Van Loon, A.A. Botterweck, R.A. Goldbohm, H.A. Brants, J.D. Van Klaveren, P.A. Van Den Brandt, Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study, *Brit. J. Cancer*, **78**, 129-135 (1998).
42. P. Taneja, P. Labhasetwar, P. Nagarnaik, J.H. Ensink, The risk of cancer as a result of elevated levels of nitrate in drinking water and vegetables in Central India, *J. Water Health*, **15**, 602-614 (2017).
43. INCA (Instituto Nacional do Câncer), *Câncer de Estômago*, URL: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>, consultado em 01 outubro de 2020.
44. INCA (Instituto Nacional do Câncer), *Atlas do INCA*, URL: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo10/consultar.xhtml#panelResultado>, consultado em 01 outubro de 2020.
45. M.S. Farias, K.M. Azevedo-Ponte, D.F. Gomes, R.S.P. Menezes, Câncer gástrico e seu dimensionamento nas redes de serviços de saúde: Estudo bibliográfico, *Rev. Saúde em Foco, Teresina*, **4**, 48-57 (2017).

46. F.X. Zhang, Y. Miao, J.G. Ruan, S.P. Meng, J.D. Dong, H. Yin, Y. Huang, F.R. Chen, Z.C. Wang, Y.F. Lai, Association between nitrite and nitrate intake and risk of gastric cancer: A systematic review and meta-analysis, *Med. Sci. Mont*, **9**, 1788-1799 (2019).
47. INCA (Instituto Nacional do Câncer), *Câncer de intestino*, URL: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>, consultado em 01 outubro de 2020.
48. INCA (Instituto Nacional do Câncer), *Linfoma não-Hodgkin*, URL: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/linfoma-nao-hodgkin>, consultado em 01 outubro de 2020.
49. P. Zhang, J. Lee, G. Kang, Y. Li, D. Yang, B. Pang, Y. Zhang, Disparity of nitrate and nitrite in vivo in cancer villages as compared to other areas in Huai River Basin, China, *Sci. Total Environm.*, **612**, 966-974 (2018).
50. M. Parvizishad, A. Dalvand, A. H. Mahvi, F. Goodarzi, A review of adverse effects and benefits of nitrate and nitrite in drinking water and food on human health, *Health Scope Int. Quart. J.*, **6**, e14164, 1-9 (2017).
51. A. Garófolo, C.M. Aversani, K.G. Camargo, M.E. Barros, S.R.J. Silva, J.A.A.C. Taddei, D.M. Sigulem, Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico, *Rev. Nutrição*, **17**, 491-505 (2004).
52. A.J. Gushgari, R.U. Halden, Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines, *Chemosphere*, **210**, 1124-1136 (2018).
53. C.D. Dutra, S. Rath, F.G.R. Reyes, Nitrosaminas voláteis em alimentos, *Alimentos e Nutrição*, **18**, 111-120 (2008).
54. M. Habermeyer, A. Roth, S. Guth, P. Diel, K. H. Engel, B. Epe, G. Eisenbrand, Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health, *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 106-128 (2014).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

F.P. de Andrade Júnior, A.L. Sobreira de Cabral, J.M. Dantas de Araújo, L. Vilar-Cordeiro, M. de Barros-Cândido, A. Pontes da Silva, B. Tamires de Medeiros-Lima, B. Braga-Dantas, Food nitrates and nitrites as possible causes of cancer: A review, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **50**(1), 269-291 (2021).

## Prediction of sulfamerazine and sulfamethazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models

Luz Elena Tinoco, Diana M. Galindres, Jhonny Osorio, Rossember E. Cárdenas\*

Grupo de Físicoquímica y Análisis Matemático, Facultad de Ciencias y Humanidades, Fundación Universidad de América, Avda Circunvalar No. 20-53, Bogotá D. C., Colombia.

\* Corresponding author: [rossember.cardenas@profesores.uamerica.edu.co](mailto:rossember.cardenas@profesores.uamerica.edu.co)

Received: 6 January 2021

Revised: 15 January 2021

Accepted: 18 January 2021

### SUMMARY

**Introduction:** Experimental Solubilities of sulfamerazine (SMR) and sulfamethazine (SMT) in some (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) cosolvent mixtures were collected from the literature at five temperatures from 293.15 to 313.15 K. **Methodology:** The results were analyzed with the van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model. It was determined that the models that best describe the solubility of these sulfonamides in (alcohol + water) mixtures were the van't Hoff and Apelblat models, obtaining correlation indices greater than 0.99 in all cases. **Results:** The results obtained with the Modified Apelblat equation presents a high correlation index for the solubility of SMR and SMT in cosolvent mixtures, followed by the van't Hoff-Yaws model that presents a high fit of the estimated data with respect to the theoretical ones. According to the two-parameter Weibull function model, the solubility of SMR and SMT in the co-solvent mixtures shows important deviations from ideality, which is consistent with the literature. The results are discussed in terms of the solute-solvent interactions that occur in this system.

**Keywords:** Sulfamerazine, sulfamethazine, solubility, van't Hoff model, Apelblat modified model, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$  model, van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model.

## RESUMEN

Predicción de la solubilidad de sulfamerazina y sulfametazina en algunas mezclas cosolventes utilizando modelos de solución no ideales

**Introducción:** las solubilidades experimentales de la sulfamerazina (SMR) y la sulfametazina (SMT) en algunas mezclas cosolventes (metanol + agua), (etanol + agua) y (1-propanol + agua), se revisaron en la literatura a cinco temperaturas de 293,15 a 313,15 K. **Metodología:** los resultados se analizaron con el modelo van't Hoff, Apelblat modificado, Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws, y el modelo de la función Weibull de dos parámetros. Se determinó que los modelos que mejor describen la solubilidad de estas sulfonamidas en mezclas (alcohol + agua) son los modelos de van't Hoff y Apelblat, obteniendo índices de correlación superiores a 0,99 en todos los casos. **Resultados:** los resultados obtenidos con la ecuación de Apelblat modificada presentan un alto índice de correlación para la solubilidad de SMR y SMT en mezclas de cosolventes, seguido del modelo van't Hoff-Yaws que presenta un alto ajuste de los datos calculados con respecto a los teóricos. Según el modelo de la función de Weibull de dos parámetros, la solubilidad de la SMR y la SMT en las mezclas de cosolventes muestra importantes desviaciones de las ideales, lo que es coherente con la literatura. Los resultados se discuten en términos de las interacciones soluto-solvente que se producen en este sistema.

*Palabras clave:* Sulfametazina, sulfamerazina, solubilidad, modelo de van't Hoff, modelo de Apelblat modificado, modelo de Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , modelo de van't Hoff-Yaws, modelo de Weibull de dos parámetros.

## RESUMO

Predição da solubilidade de sulfamerazina e sulfametazina em algumas misturas de cosolventes usando modelos de solução não ideais

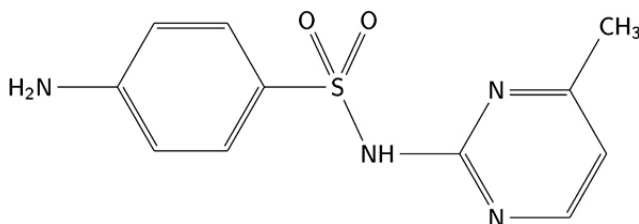
**Introdução:** as solubilidades experimentais de sulfamerazina (SMR e sulfametazina (SMT) em algumas misturas de cosolventes (metanol + água), (etanol + água) e (1-propanol + água), foram revisadas na literatura em cinco temperaturas de 293,15 a 313,15 K. **Metodologia:** os resultados foram analisados com o modelo van't Hoff, Apelblat modificado, Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws e o modelo de

função Weibull de dois parâmetros. Determinou-se que os modelos que melhor descrevem a solubilidade dessas sulfonamidas em misturas (álcool + água) são os modelos van't Hoff e Apelblat, obtendo índices de correlação superiores a 0,99 em todos os casos. **Resultados:** os resultados obtidos com a equação de Apelblat modificada apresentam um alto índice de correlação para a solubilidade de SMR e SMT em misturas de cosolventes, seguido pelo modelo de van't Hoff-Yaws que apresenta um alto ajuste dos dados calculados em relação a teóricos. De acordo com o modelo de função Weibull de dois parâmetros, a solubilidade de SMR e SMT em misturas de cosolventes apresenta desvios significativos dos ideais, o que é consistente com a literatura. Os resultados são discutidos em termos das interações soluto-solvente que ocorrem neste sistema.

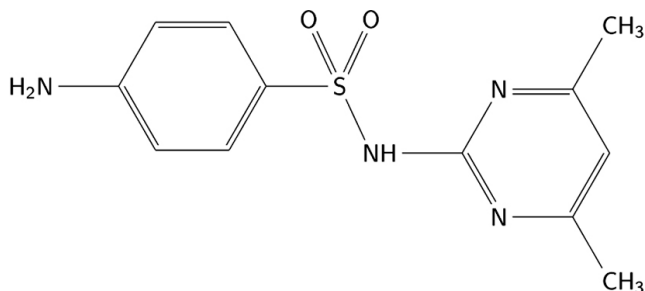
*Palavras-chave:* Sulfametazina, sulfamerazina, solubilidade, modelo van't Hoff, modelo Apelblat modificado, modelo Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , modelo van't Hoff-Yaws, modelo Weibull de dois parâmetros.

## INTRODUCTION

Sulfamerazine (4-amino-*N*-(4-methylpyrimidin-2-il) benzene-1-sulfonamide) (figure 1) and sulfamethazine (4-amino-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-il) benzene-1-sulfonamide) (figure 2) are members of the sulfonamide family [1]. Sulfonamides are derived from *p*-amino-benzene-sulfonamide and are characterized by having a benzene nucleus with an amino group (-NH<sub>2</sub>) and a sulfonamide group (-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) [2]. These compounds have been used as chemotherapeutic agents for the prevention of bacterial infections in humans [3]. Additionally, they have been recognized as a starting point for the synthesis of new drugs due to the different pharmacological actions that they can carry out, such as: anti-cancer activity, anti-tumor effect, anti-inflammatory effect, among others [4].



**Figure 1.** Molecular structure of sulfamerazine.



**Figure 2.** Molecular structure of sulfamethazine.

The solubility data of different compounds, especially the ones with pharmaceutical applications, in neat solvents and their mixtures is a very important parameter influencing the design of the drug, its evaluation, as well as its application and future optimization. It is then understandable that many experiments are carried out in order to quantify this solubility in different solvents. Such efforts are undertaken also in the field of sulfonamides and one can include here the works of Delgado *et al.* [5-9], Cruz *et al.* [10], Kodide *et al.* [11], Martínez *et al.* [12, 13], Romdhani *et al.* [14], and Blanco *et al.* [15-17]. Alongside the experimental measurements, many theoretical solubility models have been developed for accurate prediction of solubility and for better understanding of the interactions occurring in solute-solvent systems [18-22].

At present, the development of mathematical models that allow predicting the solubility of bioactive substances in solvents of industrial/pharmaceutical interest is a line of research of great importance [23-26]. Thus, the development of models allows the development of more efficient industrial processes, which in turn reduce the environmental impact [27-29].

Thus, the objective of this work is to challenge the mathematical models of van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model and two-parameter Weibull function model, from experimental solubility data, Sulfamerazine and Sulfamethazine using Python programming language.

## THEORETICAL

### Modified Apelblat Equation

The modified Apelblat equation, which is an empirical model derived from solid-liquid equilibrium [30, 31]:

$$\ln x_3 = A + BT^{-1} + C \ln T \quad (1)$$

$x_3$  refers to measured mole fraction solubility of drug in selected solvent at absolute temperature  $T$ ,  $A$  and  $B$  reflect the variation in the solution activity coefficient, and  $C$  represents the influence of temperature on enthalpy of fusion [32].

### van't Hoff-Yaws

The Yaws model are semi-empirical model included three-parameters extension that allow correlating the solubility with the temperature as follows [33]:

$$\ln(x_3) = A + \frac{B}{T} + \frac{C}{T^2} \quad (2)$$

where  $A$ ,  $B$  and  $C$  are adjustable parameters [34].

### Two-parameter Weibull function model

There is little literature that explains the dependence of temperature on the activity coefficient in equilibrium solutions. The activity coefficient in a solution is a function of  $T$  and  $x$ , but in the direction of increasing temperature, the saturation concentration approaches unity while converging with the ideal case at the limit of  $T_m$ , and the following boundary conditions explain the equilibrium activity coefficient [35, 36]:

$$\ln(\gamma_3)_{eq} = 0 \quad (3)$$

$$\left( \frac{\partial \ln \gamma_3}{\partial (1/T)} \right)_{eq} = 0 \quad (4)$$

$$\left( \frac{\partial^2 \ln \gamma_3}{\partial (1/T^2)} \right)_{eq} = 0 \quad (5)$$

At  $T = T_m$

Svärd and Rasmuson [36] identified the necessary boundary conditions for prediction of compound solubilities by extrapolation at higher or lower temperatures to the melting point. They proposed a model that meets these boundary conditions and the mathematical formula used in the probability theory and statistics of the Weibull distri-



bution was adopted. Equation 6 shows the temperature dependence of the activity coefficient of a solution in equilibrium:

$$\ln \gamma_3)_{eq} = \frac{A}{T} \left( 1 - e^{-\left(\frac{B}{T} - \frac{B}{T_m}\right)^C} \right) \quad (6)$$

where:  $A$  and  $B$  are adjustable parameters,  $C$  is a parameter that has to be above 2 in order to satisfy two boundary conditions in equation 2,  $T_m$  refers to the melting point of the substance.

### van't Hoff Equation

The van't Hoff equation is also a semi-empirical equation, which reveals the relationship between the mole fraction solubility and the temperature in an ideal solution by taking the solvent effect into account [37].

$$\ln x_3 = A + \frac{B}{T} \quad (7)$$

$A$  and  $B$  are parameters, which can be related to thermodynamic parameters such as dissolution enthalpy and dissolution entropy [38].

### Buchowski-Ksiazaczak $\lambda b$ model

In 1980, based on the generalized relationship, the Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$  equation was first proposed, which contains two parameters and is widely used to correlate solubility data:

$$\ln \left[ 1 + \frac{\lambda(1-x_3)}{x_3} \right] = \lambda b \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (8)$$

where  $\lambda$  and  $b$  are the two parameters of the  $\lambda b$  model, and  $T_m$  represents the melting point of drug [18, 39, 40].

## RESULTS AND DISCUSSION

The solubilities of sulfamerazine and sulfamethazine in mixtures of (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) were taken from Delgado and Martinez [6, 7, 41, 42].

**Table 1.** The Apelblat modified equation, van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model, van't Hoff and Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$  equations parameters for sulfamerazine in (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) cosolvent mixtures.

$w_1$	Modified Apelblat			van't Hoff-Yaws			Weibull			van't Hoff			$\lambda b$ model		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	A	B	$\lambda$	b
<b>SMR 1-Propanol</b>															
0.0	11.733	-4332.7	-1.443	1.218	-3395.8	-75706.3	1756.583	4790.2	-3902.5	2.066	0.004	1098107.6			
0.1	207.504	-13160.4	-30.477	-12.321	5288.0	-1395432.3	1529.670	5741.3	-3918.6	2.856	0.008	515871.6			
0.2	128.602	-9678.2	-18.525	-5.342	1735.6	-878682.6	1255.073	4178.3	-4084.0	4.288	0.023	176729.3			
0.3	237.843	-14706.3	-34.627	-12.016	6317.1	-1595026.4	1061.762	1822.0	-4210.6	5.346	0.052	80894.9			
0.4	258.769	-15576.6	-37.720	-13.414	7329.3	-1738227.0	948.087	1718.9	-4147.9	5.521	0.070	59160.0			
0.5	-8.135	-3382.4	2.002	6.315	-4601.0	92695.2	855.882	1681.0	-3989.7	5.308	0.077	51839.0			
0.6	479.454	-25188.8	-70.695	-30.623	17707.3	-3252548.9	780.317	4194.3	-3765.9	4.799	0.071	52700.6			
0.7	-181.060	4804.3	27.610	18.108	-11921.1	1266047.4	723.333	4217.9	-3569.6	4.343	0.065	54143.5			
0.8	169.983	-10775.3	-24.820	-9.125	4302.4	-11144589.1	715.266	4014.7	-3255.3	3.345	0.044	73386.4			
0.9	191.497	-11789.1	-28.036	-10.943	5317.2	-1304296.6	779.124	3969.7	-3301.1	3.286	0.038	86090.1			
1.0	110.035	-8330.5	-15.892	-4.912	1485.9	-757562.1	977.737	4157.0	-3532.3	3.393	0.027	128938.1			
<b>SMR Methanol</b>															
0.0	11.733	-4332.7	-1.443	1.218	-3395.8	-75706.3	1756.583	4790.2	-3902.5	2.066	0.004	1098107.6			
0.1	45.638	-6212.3	-6.251	0.018	-2105.2	-335401.6	1680.233	6083.9	-4373.0	3.847	0.008	516340.7			
0.2	-164.225	2701.7	25.412	19.426	-12898.6	1196701.4	1553.577	1543.7	-4991.0	6.370	0.032	158011.0			
0.3	-558.912	20641.6	84.194	48.794	-30586.4	3895071.0	1441.694	1474.0	-4890.6	6.438	0.041	118948.9			

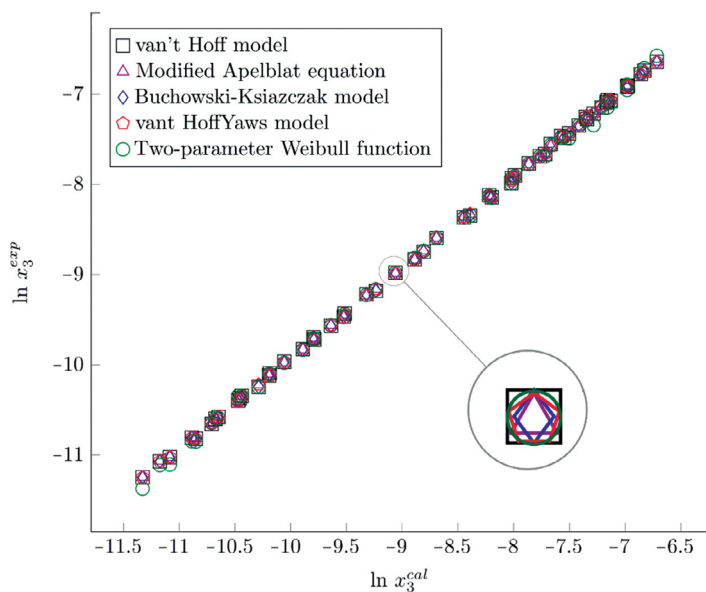
**Table 1.** (Continuation.)

0.4	-392.259	13502.8	59.235	35.103	-22420.9	2722413.1	1277.004	1623.8	-4470.3	5.529	0.038	118728.4
0.5	136.814	-10081.8	-19.586	-4.087	1550.7	-862791.0	1008.556	1783.0	-4134.5	5.273	0.056	73679.2
0.6	-376.555	13276.7	56.848	33.866	-21370.8	2638811.2	873.057	1632.2	-3963.8	5.175	0.070	55990.3
0.7	-545.947	21046.8	82.066	46.577	-28994.6	3813062.5	769.548	1582.9	-3852.6	5.155	0.085	44784.0
0.8	-122.599	2262.6	18.875	13.818	-9330.6	889742.6	676.185	4044.3	-3467.1	4.163	0.066	51720.4
0.9	240.901	-13903.5	-35.368	-14.077	7428.7	-1607687.2	618.454	3816.6	-3188.2	3.441	0.055	57373.5
1.0	-34.039	-1016.3	5.332	4.481	-4279.5	249514.5	575.828	3969.2	-2638.5	1.784	0.029	89196.2
<b>SMR Ethanol</b>												
0.0	11.733	-4332.7	-1.443	1.218	-3395.8	-75706.3	1756.583	4790.2	-3902.5	2.066	0.004	1098107.6
0.1	398.233	-22500.8	-58.524	-23.772	12856.1	-2669109.2	1626.870	3896.7	-4742.6	5.222	0.016	291001.5
0.2	177.760	-12785.5	-25.436	-5.213	2313.7	-1119243.7	1458.665	1493.9	-5048.4	6.887	0.047	106580.9
0.3	-59.975	-1617.7	9.854	11.564	-7864.6	494133.8	1217.839	1529.0	-4594.2	6.156	0.055	82964.2
0.4	137.821	-10195.4	-19.701	-4.304	1746.6	-904578.2	1019.852	1681.7	-4221.9	5.536	0.061	68567.3
0.5	-184.483	4585.1	28.254	19.628	-12712.8	1323340.2	871.392	1659.3	-3978.2	5.223	0.072	55058.6
0.6	119.973	-8932.7	-17.167	-3.667	1349.4	-769384.0	770.688	4134.3	-3723.3	4.690	0.069	53586.1
0.7	-314.192	10805.8	47.448	28.299	-18072.7	2196385.8	714.500	4712.3	-3584.8	4.421	0.069	51807.5
0.8	175.960	-11055.5	-25.694	-9.503	4581.4	-1189175.1	697.835	3941.5	-3279.0	3.479	0.048	67579.1
0.9	202.078	-12286.5	-29.581	-11.294	5626.5	-1355489.4	744.558	3953.0	-3319.5	3.458	0.043	75466.0
1.0	-497.214	19042.1	74.652	40.995	-25998.1	3395639.1	835.163	2998.7	-3623.7	4.155	0.049	73745.7

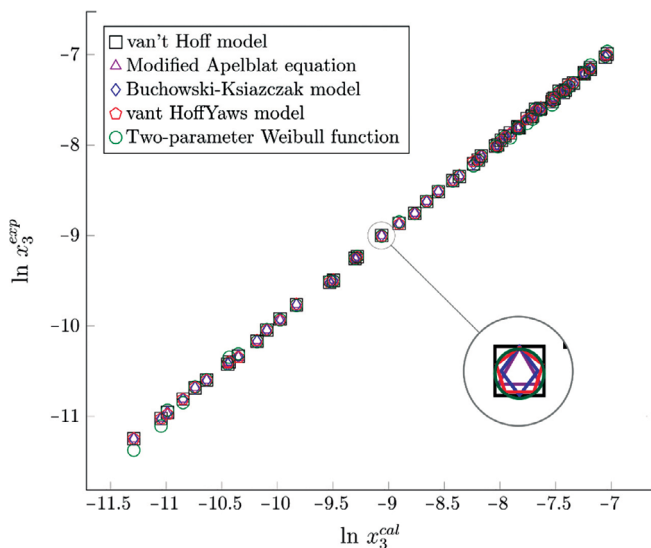
The experimental solubility data calculations were correlated with Apelblat modified equation (1), Yaws model (2), two-parameter Weibull function model (4), van't Hoff (5), Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$  (6) using *Python 3.6* version using *Pandas* and *NumPy Library*, the parameters of the models were estimated with *SciPy Library* and plots were made with *Plotly Library*.

Table 1 and table 3 show the parameters of the equations of Apelblat modified, van't Hoff-Yaws, two-parameter Weibull function model, van't Hoff, Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , for the solubility of SMR and SMT in (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) cosolvents mixtures.

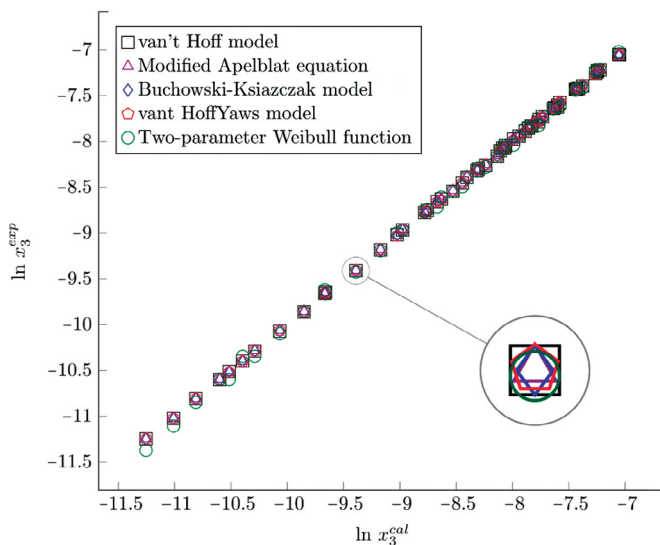
The figure 3, 4 and 5 show the experimental data *vs.* the estimated data of sulfamerazine in cosolvent mixtures, linear holdings are obtained. Table 2 shows correlation coefficients equal to 0.99, corroborating that these models show good agreement with the experimental solubility data.



**Figure 3.** Experimental solubility *vs* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazaczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model and two-parameter Weibull function model of sulfamerazine in (methanol + water) mixtures.



**Figure 4.** Experimental solubility *vs* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model and two-parameter Weibull function model of sulfamerazine in (ethanol + water) mixtures.



**Figure 5.** Experimental solubility *vs* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model and two-parameter Weibull function model of sulfamerazine in (propanol + water) mixtures.

The values of the obtained equation parameters of the solubility studied were estimated by minimizing the value of the mean squared deviation (RMSD), equation 9, and the mean absolute percentage error (MAPE) shown in equation 10, as criteria to assess the quality of the fit and the comparison between the models. The difference between these two parameters is that MAPE express precision as a percentage, it measures the size of the absolute error in percentage. While the RMSD, it is a comparative measure between two sets of data, in this case the experimental and the estimated value.

$$RMSD = \sqrt[2]{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i^{est} - x_i^{exp})^2} \quad (9)$$

where:  $x_i^{est}$  is the estimated mole fraction value,  $x_i^{exp}$  is the experimental mole fraction value and  $N$  is the number of experimental points.

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{(x_i^{est} - x_i^{exp})}{x_i^{exp}} \right| * 100 \quad (10)$$

Table 2 shows the statistical measurements of sulfamerazine in cosolvents mixtures, when evaluating the mean absolute percentage error (MAPE) and the mean square deviation (RMSD) it is evidenced that the modified Apelblat and van't Hoff-Yaws model have lowest percentage in the three solvents, 1.1% in methanol and ethanol and 0.6% in propanol, therefore these models are the ones that have the best agreement with the experimental solubility data, in the same way the Buchowski-Ksiazczak model and van't Hoff model have equal MAPE values being a value of 1.5% in methanol, 1.2% in ethanol and 0.8% in 1-propanol. However, these values are very similar for the four models, which shows good agreement with the experimental data of solubility of sulfamerazine. Additionally, Two-parameter Weibull function model shows higher values for absolute percentage error in three solvents, it is the weakest model to correlate the solubility data of the SMR at different temperatures.

**Table 2.** Statistical measures by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model and two-parameter Weibull function model of sulfamerazine in (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) mixtures.

Model	MAPE %	RMSD * 105	R2
<b>Methanol</b>			
Modified Apelblat equation	1.1	0.60	0.99973
Buchowski-Ksiazczak model	1.5	0.73	0.99960
van't Hoff model	1.5	0.73	0.99960
van't Hoff-Yaws model	1.1	0.60	0.99974
Two-parameter Weibull function	2.6	2.29	0.99614
<b>Ethanol</b>			
Modified Apelblat equation	1.1	0.43	0.99973
Buchowski-Ksiazczak model	1.2	0.56	0.99954
van't Hoff model	1.2	0.56	0.99954
van't Hoff-Yaws model	1.1	0.43	0.99973
Two-parameter Weibull function	2.1	1.00	0.99854
<b>1-Propanol</b>			
Modified Apelblat equation	0.6	0.23	0.99990
Buchowski-Ksiazczak model	0.8	0.41	0.99969
van't Hoff model	0.8	0.41	0.99970
van't Hoff-Yaws model	0.6	0.23	0.99990
Two-parameter Weibull function	2.6	0.99	0.99823

The figure 6, 7 and 8 show the experimental data *vs.* the estimated data of sulfamethazine y cosolvent mixtures, linear holdings are obtained. Table 4 shows correlation coefficients equal to 0.99, corroborating that these models show good agreement with the experimental solubility data.

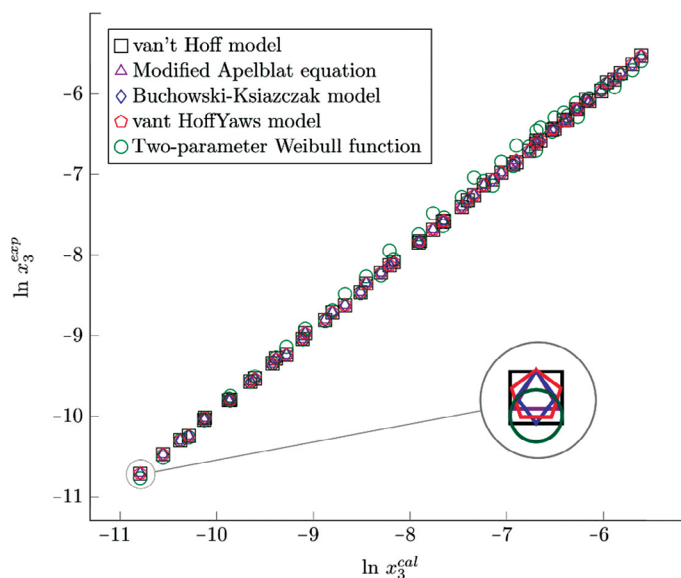
**Table 3.** The Apelblat modified equation, van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model, van't Hoff and Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$  equations parameters for sulfamethazine in (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) cosolvent mixtures.

$w_1$	Modified Apelblat			van't Hoff-Yaws			Weibull			van't Hoff			$\lambda b$ model	
	A	B	C	A	B	C	A	B	A	B	A	B	$\lambda$	b
<b>SMT 1-Propanol</b>														
0.0	-29.735	-2645.3	4.938	5.595	-5459.2	199425.5	1785.7	17758299.2	-4169.4	3.511	0.004	941865.3		
0.1	-257.059	7864.0	38.817	22.989	-15676.3	1783934.1	1498.6	17681476.5	-3908.3	3.592	0.008	472168.4		
0.2	-431.979	15808.9	65.017	37.238	-23708.1	3001369.3	1188.3	17460186.3	-3909.2	4.604	0.022	172087.1		
0.3	-560.615	21798.3	84.177	46.373	-29055.3	3838862.1	1001.8	17165885.0	-3761.4	4.730	0.035	107231.1		
0.4	-854.144	35223.9	127.873	68.256	-42230.8	5862557.5	864.2	16769658.0	-3592.3	4.627	0.044	80173.0		
0.5	-408.747	15274.8	61.504	35.042	-22059.1	2831894.2	765.4	16391865.3	-3380.4	4.258	0.047	70268.7		
0.6	-278.147	9457.58	42.050	25.407	-16153.3	1949227.4	693.7	15991168.5	-3294.3	4.210	0.054	60066.6		
0.7	-247.743	8098.78	37.544	23.475	-14883.2	1757892.8	640.2	15651579.0	-3290.8	4.374	0.064	50554.8		
0.8	-184.613	5281.2	28.134	18.205	-11683.4	1278195.5	621.5	15486345.3	-3256.2	4.322	0.065	49007.6		
0.9	-129.034	2946.9	19.732	13.631	-9207.1	935364.1	666.0	15839057.3	-3046.3	3.492	0.043	68737.1		
1.0	-1170.531	50403.7	174.480	88.345	-55451.4	8025134.5	868.3	16811669.7	-2601.9	1.383	0.012	202486.7		
<b>SMT Methanol</b>														
0.0	-29.735	-2645.3	4.938	5.595	-5459.2	199425.5	1785.7	17758299.2	-4169.4	3.511	0.004	941865.3		
0.1	129.514	-10010.8	-18.601	-4.783	1329.4	-863936.4	1647.8	17730292.1	-4377.9	4.637	0.009	496244.4		
0.2	-218.239	5588.4	33.340	22.461	-14730.99	1547498.0	1485.2	17681247.1	-4520.3	5.628	0.017	257011.1		

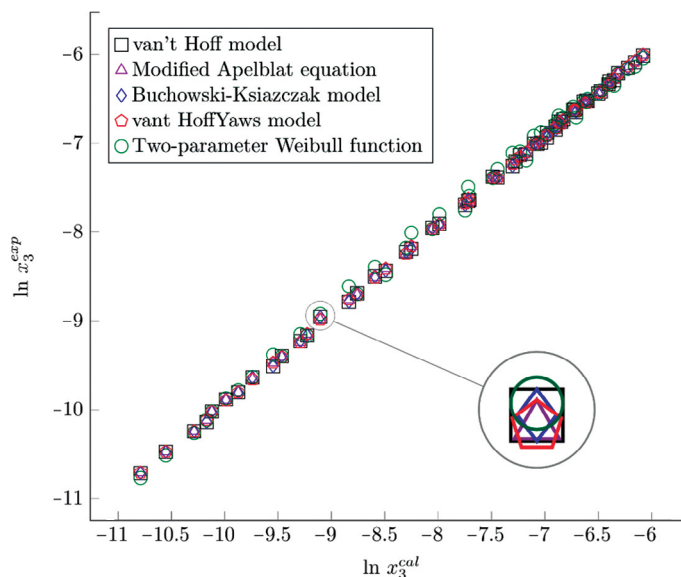


**Table 3.** (Continuation.)

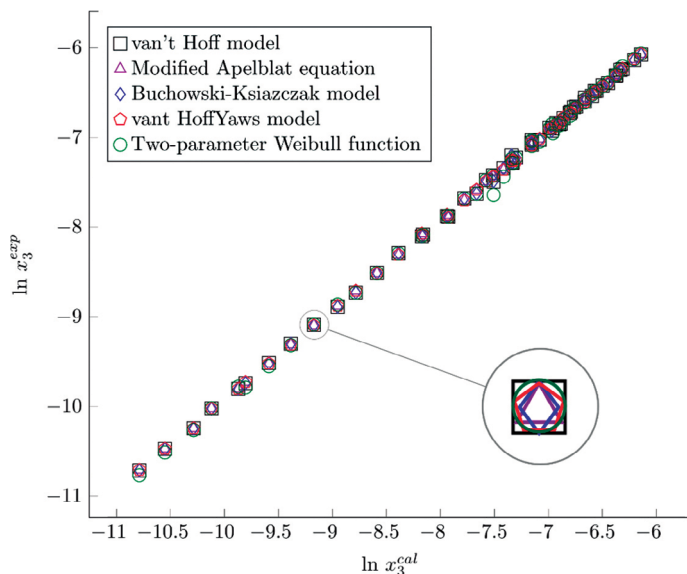
0.3	13.143	-4973.8	-0.953	6.857	-4756.5	11167.7	1307.7	17578586.5	-4671.4	6.698	0.037	125117.8
0.4	-95.146	-123.3	15.306	15.624	-9614.9	735315.2	1114.7	17373506.8	-4752.7	7.591	0.077	61829.6
0.5	48.936	-6669.9	-6.039	5.173	-2891.7	-295165.9	958.0	17074271.4	-4854.8	8.435	0.144	33604.5
0.6	-2.496	-4376.69	1.715	10.025	-5507.7	92693.8	821.0	16700326.8	-4897.8	9.022	0.237	20623.5
0.7	20.927	-5412.5	-1.711	8.439	-4288.6	-91772.1	690.1	16034911.0	-4904.9	9.472	0.367	13321.1
0.8	-396.269	13628.2	60.371	39.239	-22954.2	2770010.5	574.4	15174546.0	-4707.1	9.206	0.428	10973.7
0.9	-184.256	4382.4	28.648	22.158	-12826.3	1291516.8	508.6	14502689.3	-4327.9	8.186	0.343	12569.9
1.0	150.052	-10567.0	-21.202	-2.918	2293.7	-974832.5	472.4	14064973.4	-4141.5	7.697	0.311	13241.8
<b>SMT Ethanol</b>												
0.0	-29.735	-2645.3	4.938	5.595	-5459.2	199425.5	1785.7	17758299.2	-4169.4	3.511	0.004	941865.3
0.1	-481.298	17498.9	72.437	41.808	-26736.9	3375732.6	1594.0	17720052.8	-4461.0	5.109	0.012	384351.8
0.2	-758.209	29664.2	113.991	64.651	-39744.3	5281240.3	1378.3	17639351.2	-4929.8	7.307	0.040	124134.9
0.3	-560.132	20664.7	84.652	50.640	-30696.7	3894112.3	1152.2	17427724.1	-5018.1	8.331	0.092	54604.6
0.4	-542.299	20002.0	82.016	49.224	-29619.1	3751396.4	974.9	17117421.5	-4895.7	8.511	0.142	34295.0
0.5	-475.383	17254.9	71.981	43.836	-26340.7	3299394.6	823.9	16695097.4	-4590.3	8.010	0.164	27824.3
0.6	-507.294	18838.7	76.716	46.371	-27800.8	3543259.1	711.6	16171414.4	-4429.0	7.851	0.197	22390.7
0.7	-381.898	13433.0	57.933	36.280	-21829.6	2682154.3	644.4	15707837.2	-4145.6	7.147	0.176	23334.4
0.8	-311.337	10540.2	47.275	29.750	-18140.2	2174284.9	614.6	15431447.9	-3813.2	6.161	0.131	28747.5
0.9	-363.547	13055.1	54.939	33.211	-20500.9	2561126.8	651.8	15783238.3	-3610.9	5.380	0.091	39176.2
1.0	-422.913	15818.4	63.684	36.342	-22680.4	2908189.6	738.8	16255186.4	-3506.3	4.755	0.060	57362.9



**Figure 6.** Experimental solubility *vs* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures.



**Figure 7.** Experimental solubility *vs* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model of sulfamethazine in (ethanol + water) mixtures.



**Figure 8.** Experimental solubility *vs.* estimated solubility by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model of sulfamethazine in (1-propanol + water) mixtures.

Table 4 shows the statistical measurements of sulfamethazine in cosolvent mixtures, when evaluating the mean absolute percentage error (MAPE), the same behavior as for sulfamerazine is evidenced. The models that show the best relationship are the modified Apelblat model and the van't Hoff-Yaws model. There is a good correlation between the experimental results and those obtained theoretically in this study with these models. Subsequently, a good correlation is found with the data of the Buchowski-Ksiazczak model and van't Hoff model and finally for the Two-parameter Weibull function model the mean absolute percentage error has higher values in the case of the three solvents. For SMR and SMT, it is evident that for most models, the lowest MAPE values are found for the propanol.

Table 2 and table 4 show that in all cases the same behavior mentioned above was obtained for MAPE when the mean square deviation (RMSD) is analyzed, the following behavior is found: **RMSD:** Apelblat modified model = van't Hoff-Yaws model < Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$  = van't Hoff model < Two-parameter Weibull function model.

This statistical measure corroborates that the models that have the best fit with the experimental measures are Apelblat modified model and van't Hoff-Yaws model in all co-solvent mixtures.

**Table 4.** Statistical measures by van't Hoff, Apelblat modified, Buchowski-Ksiazczak  $\lambda b$ , van't Hoff-Yaws model, two-parameter Weibull function model of sulfamethazine in (methanol + water), (ethanol + water) and (1-propanol + water) mixtures.

Model	MAPE %	RMSD * 105	R2
<b>Methanol</b>			
Modified Apelblat equation	1.2	2.06	0.99960
Buchowski-Ksiazczak model	1.3	2.28	0.99951
van't Hoff model	1.3	2.28	0.99951
van't Hoff-Yaws model	1.2	2.07	0.99960
Two-parameter Weibull function	5.3	8.20	0.99368
<b>Ethanol</b>			
Modified Apelblat equation	1.3	1.41	0.99957
Buchowski-Ksiazczak model	1.9	1.96	0.99917
van't Hoff model	2.0	1.98	0.99915
van't Hoff-Yaws model	1.3	1.41	0.99957
Two-parameter Weibull function	4.3	3.73	0.99698
<b>1-Propanol</b>			
Modified Apelblat equation	1.0	1.21	0.99962
Buchowski-Ksiazczak model	1.6	1.81	0.99915
van't Hoff model	1.7	1.85	0.99912
van't Hoff-Yaws model	1.0	1.21	0.99962
Two-parameter Weibull function	4.0	4.24	0.99537

## CONCLUSIONS

The use of the Python programming language has proven to be very useful to determine the parameters of the different models developed in this research. The theoretical results, obtained through each of the mathematical models used, present small deviations with respect to the experimental data, also indicating the relevance of the mathematical models to calculate the solubility data of sulfamerazine and sulfamethazine in co-solvent mixtures.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge support from the Faculty of Science and humanities and research direction of the Fundación Universidad de America. Further, Colciencias supported the doctoral fellowship [6172] to Diana M. Galindres.

## DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## REFERENCES

1. R. Cohen-Adad, S. Lindenbaum, J.W. Lorimer, A.N. Paruta, R. Piekos, M. Salomon, Introduction to the series on solubility of solids in liquids: subseries on pharmaceuticals, in: *4-Aminobenzenesulfonamides*, Elsevier, Rhode Island, 1989, pp. 1-523.
2. S. Mondal, S. Malakar, Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances, *Tetrahedron*, **76**, 131662 (2020).
3. E.N. Krylov, M.S. Gruzdev, U.V. Chervonova, L.V. Virzum, D. Sarkar, Synthesis, reactivity, acidic and pharmaceutical properties of sulphonamides, in: *Sulfonamides: An Overview*, edited by D. Sarkar, Nova, Odisha, 2020.
4. 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).
5. D.R. Delgado, O. Bahamón-Hernandez, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, F. Martínez, E. Rahimpour, A. Jouyban, W.E. Acree, Jr., Solubility of sulfadiazine in (acetone-trile + methanol) mixtures: Determination, correlation, dissolution thermodynamics and preferential solvation, *J. Mol. Liq.*, **322**, 114979 (2021).
6. D.R. Delgado, O.A. Almanza, F. Martínez, M.A. Peña, A. Jouyban, W.E. Acree, Jr., Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures, *J. Chem. Thermodyn.*, **97**, 264-276 (2016).
7. D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamerazine in methanol + water mixtures, *J. Solut. Chem.*, **44**, 360-377 (2015).
8. 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).
9. D.R. Delgado, D.I. Caviedes-Rubio, C.P. Ortiz, Y.L. Parra-Pava, M.Á. Peña, A. Jouyban, S.N. Mirheydari, F. Martínez, W.E. Acree, Jr., Solubility of sulphadia-

- zine in (acetonitrile + water) mixtures: measurement, correlation, thermodynamics and preferential solvation, *Phys. Chem. Liq.*, **58**, 381-396 (2020).
10. A.M. Cruz-González, M.S. Vargas-Santana, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, F. Martínez, A. Jouyban, W.E. Acree, Jr., Solubility of sulfadiazine in (ethylene glycol + water) mixtures: Measurement, correlation, thermodynamics and preferential solvation, *J. Mol. Liq.*, **323**, 115058 (2021).
  11. K. Kodide, P. Asadi, J. Thati, Solubility and thermodynamic modeling of sulfanilamide in 12 mono solvents and 4 binary solvent mixtures from 278.15 to 318.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, **64**, 5196-5209 (2019).
  12. F. Martínez, A. Gómez, Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in octanol, water, and the mutually saturated solvents, *J. Solut. Chem.*, **30**, 909-923, (2001).
  13. F. Martínez, C.M. Ávila, A. Gómez, Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane, *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**, 803-808 (2003).
  14. A. Romdhani, F. Martínez, O.A. Almanza, M.A. Peña, A. Jouyban, W.E. Acree, Solubility of sulfacetamide in (ethanol + water) mixtures: Measurement, correlation, thermodynamics, preferential solvation and volumetric contribution at saturation, *J. Mol. Liq.*, **290**, 111219 (2019).
  15. 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**, 234-255 (2020).
  16. 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).
  17. 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).

18. R.E. Cárdenas, L.E. Tinoco, D.M. Galindres, A. Beltrán, C.D. Oviedo, J. Osorio, Prediction of sulfadiazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**, 822-842 (2020).
19. 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, *Alex. Eng. J.*, **60**, 905-914 (2021).
20. 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).
21. Z.J. Cárdenas, D.M. Jiménez, G.A. Rodríguez, D.R. Delgado, F. Martínez, M. Khoubnasabjafari, A. Jouyban, Solubility of methocarbamol in some cosolvent + water mixtures at 298.15 K and correlation with the Jouyban-Acree model, *J. Mol. Liq.*, **188**, 162-166 (2013).
22. D.M. Cristancho, D.R. Delgado, F. Martínez, Meloxicam solubility in ethanol + water mixtures according to the extended Hildebrand solubility approach, *J. Solut. Chem.*, **42**, 1706-1716 (2013).
23. D.R. Delgado, E.M. Mogollon-Waltero, C.P. Ortiz, M. Peña, O.A. Almanza, F. Martínez, A. Jouyban, Enthalpy-entropy compensation analysis of the triclocarban dissolution process in some {1,4-dioxane (1) + water (2)} mixtures, *J. Mol. Liq.*, **271**, 522-529 (2018).
24. 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**, 25-38 (1984).
25. 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**, 720-726 (2012).
26. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of some sulfonamides in 1,4-dioxane + water co-solvent mixtures at 298.15 K according to the inverse Kirkwood-Buff integrals method, *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat.*, **38**, 104-114 (2014).

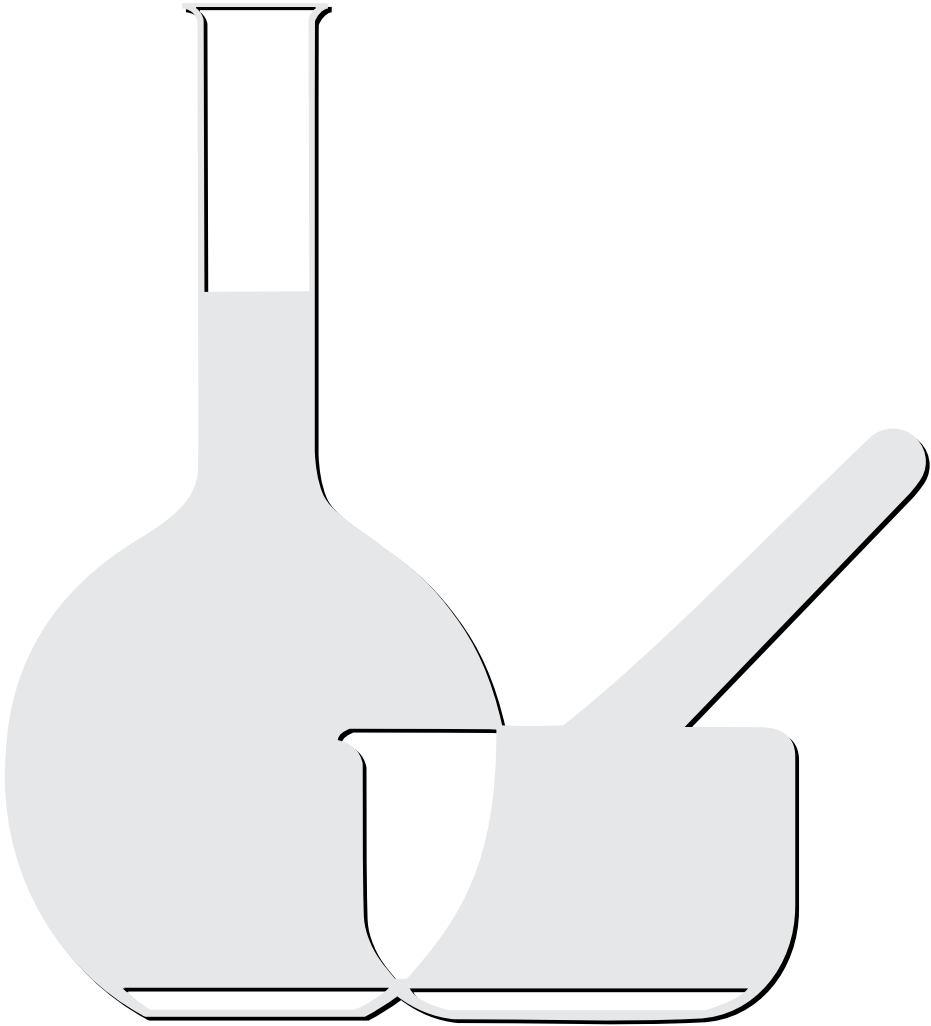
27. B.J. Boyd, C.A.S. Bergström, Z. Vinarov, M. Kuentz, J. Brouwers, P. Augustijns, M. Brandl, A. Bernkop-Schnürch, N. Shrestha, V. Prétat, A. Müllertz, A. Bauer-Brandl, V. Jannin, Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **137**, 104967 (2019).
28. S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B*, **5**, 442-453 (2015).
29. Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu, Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review, *J. Hazard. Mater.*, **262**, 189-211 (2013).
30. S.V. Blokhina, M.V. Ol'khovich, A.V. Sharapova, I.B. Levshin, G.L. Perlovich, Thermodynamic insights to solubility and lipophilicity of new bioactive hybrids triazole with thiazolopyrimidines, *J. Mol. Liq.*, 114662 (2020), doi: 10.1016/j.molliq.2020.114662.
31. A. Noubigh, M. Habib-Oueslati, Measurement and modeling of the solubility of vanillin constituent of olive mill wastewater in binary water + ethanol solvents mixtures between 278.15 K and 308.15 K, *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **8**, 396-403 (2014).
32. R. Heryanto, M. Hasan, E. Chan-Abdullah, A. Cahyo-Kumoro, Solubility of stearic acid in various organic solvents and its prediction using non-ideal solution models, *ScienceAsia*, **33**, 469-472 (2007).
33. Q. Jia, D. Lei, S. Zhang, J. Zhang, N. Liu, K. Kou, Solubility measurement and correlation for HNIW•TNT co-crystal in nine pure solvents from T = (283.15 to 318.15) K, *J. Mol. Liq.*, 114592 (2020), doi: 10.1016/j.molliq.2020.114592.
34. D. Yang, L. Fu, D. Shi, J. Li, Q. Zhang, Solubility of 3,7,9,11-tetraoxo-2,4,6,8,10-pentaaza[3.3.3] propellane (TOPAP) in different pure solvents at temperatures between 273.15 and 318.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, **61**, 3277-3285 (2016).
35. M.A.M. Khan, L. Ahrné, J.C. Oliveira, F.A.R. Oliveira, Prediction of water and soluble solids concentration during osmotic dehydration of mango, *Food Bioprod. Process.*, **86**, 7-13 (2008).
36. M. Svård, Å.C. Rasmuson, (Solid + liquid) solubility of organic compounds in organic solvents - Correlation and extrapolation, *J. Chem. Thermodyn.*, **76**, 124-133 (2014).



37. A.M. Romero-Nieto, D.I. Caviedes-Rubio, J. Polania-Orozco, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, Temperature and cosolvent composition effects in the solubility of methylparaben in acetonitrile + water mixtures, *Phys. Chem. Liq.*, **58**, 722-735 (2020).
38. A.M. Romero Nieto, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, Measurement and correlation of solubility of ethylparaben in pure and binary solvents and thermodynamic properties of solution, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**, 332-347 (2019).
39. A. Książczak, J.J. Kosinski, Vapour pressure of binary, three-phase (S-L-V) systems and solubility, *Fluid Phase Equilib.*, **44**, 211-236 (1988).
40. A. Książczak, K. Moorthi, I. Nagata, Solid-solid transition and solubility of even n-alkanes, *Fluid Phase Equilib.*, **95**, 15-29 (1994).
41. 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).
42. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and solution thermodynamics of some sulfonamides in 1-propanol + water mixtures, *J. Solut. Chem.*, **43**, 836-852 (2014).

## HOW TO CITE THIS ARTICLE

L.E. Tinoco, D.M. Galindres, J. Osorio, R.E. Cárdenas, Prediction of sulfamerazine and sulfamethazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 292-313 (2021).



## 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](mailto:rcciquifa_fcbog@unal.edu.co) o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al Comité Editorial. Después de que los evaluadores o el Comité Editorial lleven a cabo

una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de este ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para su publicación en otros medios.

### Criterios para la presentación de manuscritos

- La fuente de los manuscritos debe ser Times New Roman tamaño 12.
- No se admiten notas a pie de página.
- Título, centrado y en minúscula.
- Autor(es) con su respectiva filiación institucional y correo electrónico del autor principal.
- Resumen, *Summary* o Resumen. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palabras chave (debajo de Resumen). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index

Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

- En los manuscritos en español y portugués se empleará la coma (,) como separador decimal, en inglés se utilizará el punto (.).
- Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: Introducción, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones (si las hay), Agradecimientos, Conflicto de intereses y Referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.
- Las tablas deben llevar numeración 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  $\epsilon$ ) nm ( $\log \epsilon$ ). Ej.: UV  $\lambda$  max (MeOH) 275 ( $\log \epsilon$  2,94).

IR  $\nu$  max (medio)  $\text{cm}^{-1}$ . Ej.: IR  $\nu$  max (KBr) 1740, 1720  $\text{cm}^{-1}$ .

EM  $m/z$  (% intensidad relativa). Ej.: em  $m/z$  (%): 340 ( $M^+$ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN  $^1\text{H}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 3,84 (1H, *d*, J = 10,3 Hz, H-30).

RMN  $^{13}\text{C}$  (solvente, frecuencia de registro)  $\delta$  ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) 16,60 (t, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol,  $\text{CHCl}_3$  = cloroformo,  $\text{C}_6\text{H}_6$  = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo,  $\text{Me}_2\text{CO}$  = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción

### Referencias de los manuscritos

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, así:

**Revistas:** Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la revista debe ir en letra *itálica*, **volumen en negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

**Comunicaciones personales:** Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

**Libros:** Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

**Capítulos de libros escritos por varios autores:** Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de: En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

**Tesis:** Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, *título en cursiva*, Tesis de..., institución, ciudad, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, *Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas*, Tesis de Grado, Universidad del Valle, Cali, 1983, pp. 14-16.

**Referencias de Internet:** Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista *rcciquifa\_fcbog@unal.edu.co*

**Comité Editorial**

Revista Colombiana de Ciencias  
Químico-Farmacéuticas  
Departamento de Farmacia  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.º 45-03  
Fax: 57-1-3165060

Bogotá - Colombia  
Correo electrónico:  
*rcciquifa\_fcbog@unal.edu.co*

Dirección WEB:  
*http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa*

*Revista Colombiana*  
*de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 50(1)*  
se terminó de editar, imprimir y encuadernar  
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos  
Bogotá, D. C., Colombia.

