

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

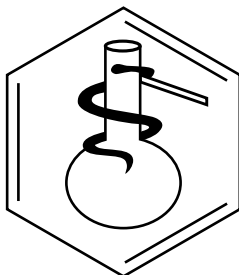


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



**REVISTA COLOMBIANA
DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS
Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.
Correo electrónico: rciquifa_fbog@unal.edu.co
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rciquifa>
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=
<https://scholar.google.com/citations?user=TuBT68sAAA&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

Comité Científico:

Alejandro Sosnik, Ph. D., Department of Materials Science and Engineering, Israel Institute of Technology (Technion), Haifa, Israel.
Carlos Bregni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Juan M. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.
Juan R. Perilla, Ph. D., Department of Chemistry and Biochemistry, College of Arts and Sciences, University of Delaware, Newark, Delaware, U.S.A.
Mario F. Guerrero, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Mario G. de Carvalho, Ph. D., Departamento de Farmácia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.
Martha R. Fontanilla, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Rubén H. Manzo, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
Victor Romanowski, Ph. D., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
William E. Acree, Jr., Ph. D., Department of Chemistry, University of North Texas, Denton, Texas, U.S.A.

Comité Editorial:

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

Evaluadores:

Alba M. Romero, M. Sc., Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.
Angélica M. Santis, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
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.
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.
Diego I. Caviades, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Dorian Polo, Ph. D., Departamento de Química, Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
José J. López, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Luis F. Ospina, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Manuel García-Florez, Ph. D., Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.
Paola A. Acevedo, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Paola A. Rivera, Ph. D., Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.
Rinaldo G. Sotomayor, M. Sc., Programa de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico, Colombia.
Ximena Zarate, Ph. D., Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma De Chile, Santiago, Chile.
Zaira J. Cárdenas, M. Sc., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

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

Edición, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá.

Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: procceditor@yahoo.es

MISIÓN

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

VISIÓN

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

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

ÉTICA

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

LICENCIA CREATIVE COMMONS



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

Contenido

Características de salud y adherencia farmacoterapéutica en el adulto mayor del municipio de Acacías, Colombia Sergio Aldemar Polanco Leal, Ingrid Zuley Rivera Gutiérrez, Emilce Salamanca Ramos, Zulma Velasco Páez	325
Desarrollo tecnológico e introducción del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el Cuadro Básico de Medicamentos Nacional de Cuba Nancy Burguet-Lago, Yenilen Troche-Concepción, Leisy Baró-Rodríguez, María Victoria Martínez-Betancourt, Griset Toledo-Carrabeo	339
Metabolitos secundarios aislados de especies de la familia Myristicaceae que producen inhibición enzimática Xiomara Alejandra Cabrera Martínez, Luis Enrique Cuca Suarez	352
Study of the use of IVIG Normal Human Immunoglobulin in the University Hospital of La Samaritana during the period of 2017-2019 Lizeth Daniela Quiroga Robayo, Mónica Patricia Montañó Avila, José Julián López Gutiérrez	386
Evaluación del agua minero-medicinal de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia del Chaco - Argentina Yanina P.D. Erceg, Néstor H. Dudik, Gerardo A. Sáez, Erica M. Soria, Cristian Herman, María B. Nuñez	406
Análisis del desecho de medicamentos en Costa Rica durante el 2019, un paso hacia la Ecofarmacovigilancia María José Muñoz-Bejarano, Yoselyn Ruiz Rodríguez, Gustavo Sáenz-García, Ramsés Alfaro-Mora	423
Síntesis en fase sólida de un neuropéptido cosmeceútico y su microencapsulación en un sistema liposomal J. Andrés Sandoval A., Jaiver E. Rosas P	439
Official labeled and unlabeled Brazilian honey. Comparison between physicochemical, microbiological, and microscopic parameters Gabriel S. Silva, Vinícius Bernardoni, Rânia M. Santana, Paula S.S.T. Calaça, Débora S. Assis, William G. Lima, Livia C.P. Gardoni, Júlio C.M. Brito	457
Regulación de la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos en España: riesgos y ventajas en situaciones excepcionales. Silvia Enríquez-Fernández	476

- Incorporación de un novedoso complejo de tinidazol con propiedades antimicrobianas a dos formas semisólidas de uso tópico
Dina Marcela Martínez Carmona, Gloria Elena Tobón Zapata 490
- Synthesis and antileishmanial activity of naphthoquinone-based hybrids
Délis Galvão Guimarães, Sidney Silva Simplício, Valéria Carlos de Sousa, Klinger Antonio da Franca Rodrigues, Fernando Aécio A. Carvalho, Sabrina M. P. Carneiro, Marcília Pinheiro da Costa, Arlan de A. Gonsalves, Cleônia Roberta M. Araújo 505
- Polimedicación, prescripción inapropiada y eventos adversos a fármacos en ancianos hospitalizados: un problema de seguridad del paciente
Ana Virginia Fajreldines, Estefanía Barberis, María Belén Beldarraín, Mariana Analía Valerio, Viviana Rodríguez, Marcelo Pellizzari 522
- Avaliação da farmacoterapia no âmbito hospitalar veterinário como ferramenta de promoção na segurança do paciente
Marcelo Rodrigues Martins, Karina Barbosa dos Santos, Camylla Alves Silva, Fernanda de Siqueira, Angela Ferreira Lopes, Adilson Donizeti Damasceno 533
- Evaluation of eggshell membrane as an alternative biopolymeric matrix for delivery of nimesulide
Georgetown Almir Oliveira da Silva, Cleônia Roberta Melo Araújo, Arlan de Assis Gonsalves 550
- Chemical constituents, larvicidal activity and molluscicidal from fresh leaves of *Alpinia zerumbet* (Pers.) and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf
Paulo Victor Serra Rosa, Paulo Sérgio Santos Júnior, Irlane Thais Pereira de Sousa, Igor Santos da Silva, Wilma Karlla dos Santos Farias, Laurilene dos Santos Souza, Lauriane dos Santos Souza, Danielly Fonseca, Ari Pereira de Araújo Neto, Gustavo Oliveira Everton 571

Características de salud y adherencia farmacoterapéutica en el adulto mayor del municipio de Acacías (Colombia)

Sergio Aldemar Polanco Leal ^{1a}, Ingrid Zuley Rivera Gutiérrez ^{1b}, Emilce Salamanca Ramos ^{2c}, Zulma Velasco Páez ^{2d}

¹ Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de los Llanos, Sede San Antonio, Calle 37 N.° 41-02 Barzal, Villavicencio, Colombia.

^a Correo electrónico: sergio.polanco@unillanos.edu.co

^b Correo electrónico: ingrid.rivera@unillanos.edu.co

² Escuela de Salud Pública, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de los Llanos, Sede San Antonio, Calle 37 N.° 41-02 Barzal, Villavicencio, Colombia.

^c Correo electrónico: esalamanca@unillanos.edu.co

^d Correo electrónico: zvelasco@unillanos.edu.co

Recibido: 11 de febrero de 2019

Revisado: 27 de enero de 2021

Aceptado: 28 de enero de 2021

RESUMEN

Introducción: el envejecimiento es una preocupación que ocupa las políticas públicas en todos los países del mundo. **Objetivo:** analizar la adherencia, el uso de medicamentos y el estado de salud en los adultos mayores del municipio de Acacías (Colombia). **Metodología:** estudio descriptivo, muestreo no probabilístico discrecional, n= 96 adultos mayores. **Resultados:** 64,6% de los adultos mayores consumen medicamentos; el 62,9% no son adherentes al tratamiento farmacológico, existe una correlación significativa a través del MEC (minexamen cognoscitivo), el 46,2% de ellos padecen algún tipo de deterioro cognitivo. **Conclusiones:** existe una correlación entre la no adherencia con el estado cognitivo y el apoyo familiar.

Palabras clave: Adherencia al tratamiento, adulto mayor, medicamento.

SUMMARY

Health characteristics and pharmacotherapeutic adherence in the elderly in the municipality of Acacías (Colombia)

Introduction: aging is a concern that occupies public policies in all countries of the world. **Objective:** to analyze the adherence, use of medications and health status in the elderly of the municipality of Acacías (Colombia). **Methodology:** descriptive study, non-probabilistic discretionary sampling, n= 96 older adults. **Results:** 64.6% of older adults consume medications; 62.9% are not adherent to pharmacological treatment, there is a significant correlation through the MCC (Mini Cognitive Examination), 46.2% of them suffer some type of cognitive deterioration. **Conclusions:** there is a correlation between non-adherence with cognitive status and family support.

Keywords: Adherence to treatment, older adult, medication.

RESUMO

Características de saúde e adesão farmacoterapêutica em idosos do município de Acacías (Colômbia)

Introdução: o envelhecimento é uma preocupação que ocupa políticas públicas em todos os países do mundo. **Objetivo:** analisar a adesão, o uso de medicamentos e o estado de saúde dos idosos do município de Acacías (Colômbia). **Metodologia:** estudo descritivo, amostragem não probabilística discricionária, n= 96 idosos. **Resultados:** 64,6% dos idosos consomem medicamentos; 62,9% não aderem ao tratamento farmacológico, existe uma correlação significativa através do MEC (mini exame cognitivo), 46,2% deles sofrem de algum tipo de deterioração cognitiva. **Conclusões:** há correlação entre a não adesão com o estado cognitivo e o suporte familiar.

Palavras-chave: Adesão ao tratamento, idoso, medicamentos.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es una etapa en la que todos los seres humanos experimentan cambios biológicos y psicológicos, que están relacionados con diferentes factores de tipo social, económico, cultural y ecológico del entorno donde se desarrolla su vida [1, 2], influyendo de manera directa en el proceso de envejecimiento desde una edad temprana. Los cambios que experimenta el adulto mayor no vienen dados específicamente por la edad, algunos septuagenarios gozan de un estado de salud excelente, mientras que otros son frágiles y necesitan de intervenciones dentro del marco del cuidado del adulto mayor [2].

Además de los cambios biológicos que pueden experimentar las personas mayores cabe mencionar que el proceso de envejecer está asociado con otras situaciones de vida [3], como la jubilación, viviendas apropiadas, pérdida de amigos, familiares o la pareja; por lo tanto, la respuesta sanitaria en salud pública es un factor contribuyente a la mejora en la calidad de vida de los adultos mayores y, por ende, podría relacionarse con la prevención de algunos estados patológicos [4, 5].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [4], la población geriátrica a nivel mundial pasará del 12% al 22% entre el 2015 y 2050, la cantidad de personas entre 80 y 90 años aumentará cuatro veces más hasta alcanzar aproximadamente los 395 millones de adultos mayores [4]. En Latinoamérica, el envejecimiento se está dando a un ritmo acelerado, pero hay un insuficiente crecimiento institucional y, en efecto, se presenta desigualdad social en salud, acceso inequitativo a medicamentos y ausencia de valoración geriátrica por parte del profesional correspondiente. Este envejecimiento gradual se está presentando en todos los países, pero con diferentes variables [6].

Las condiciones de salud del adulto mayor pueden ser observadas a través de la medición de diferentes aspectos que se relacionan con la misma, la presencia de diferentes enfermedades o cifras de comorbilidad; según una investigación elaborada por Sarro *et al.* [7], el 44% de su población objeto de estudio presentó índices de comorbilidad, incluyendo la presencia de diversas enfermedades tal como lo reportaron Velásquez *et al.* [8], las enfermedades prevalentes corresponden a hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 1 y 2, cardiopatía isquémica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia renal crónica, enfermedad ácido péptica e insuficiencia hepática. Por otro lado, de acuerdo con el estudio de Cardona *et al.* [9], hay una relación entre las condiciones de salud del adulto mayor y su estado nutricional, los autores clasificaron con mala nutrición a más del 50% de la población de estudio, 69% tenía hiperglucemia; para la medición de las actividades básicas de la vida diaria reportan que a mayor edad hay mayor dependencia (prevalció el género femenino). Otros de los aspectos para

tener en cuenta para la valoración del estado de salud del adulto mayor son los índices depresivos y cognitivos [7, 10, 11], lo cual influye y afecta en su calidad de vida.

Por una parte, la polifarmacia en el adulto mayor es cada vez más frecuente debido a diferentes factores que afectan la salud de la población (presencia de diferentes enfermedades, edad avanzada y pérdida en diferentes actividades de la vida diaria) [12]. Los prescriptores incomunicados dentro del ciclo de reconciliación de medicamentos en las personas mayores son causales del incremento en las cifras de ancianos polimedcados, puesto que al momento de medicar, el profesional de salud facultado debe tener en cuenta las diferentes características de los medicamentos para minimizar el impacto que se está generando por la polimedcación [13]. La adherencia terapéutica insuficiente afecta principalmente a los adultos mayores, debido a la prevalencia de deficiencias cognitivas, funcionales, regímenes médicos complejos además de múltiples comorbilidades y el manejo de estas; por otra parte, el declive de la función hepática, renal y cardíaca alteran considerablemente modificaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas de los medicamentos, así los adultos mayores son vulnerables a efectos colaterales relacionado con su medicación [14].

En países desarrollados, la adherencia farmacoterapéutica es apenas del 50% en pacientes con enfermedades crónicas [15]. El incumplimiento con el tratamiento farmacoterapéutico se ha convertido en un problema de salud pública, que con el paso del tiempo aumenta significativamente, aún más en los países en desarrollo como consecuencia de inequidades a acceso de la atención en salud y a la insuficiencia de recursos económicos [15]. La no adherencia es el origen principal de que no se logre obtener el beneficio completo de los medicamentos, lo que puede repercutir directamente en la calidad de vida de los pacientes, adicionalmente, contribuye al desabastecimiento monetario debido al costo de nuevas intervenciones, así como al aumento de discapacidades y muertes; la adherencia es influenciada por diferentes causas relacionadas con aspectos económicos, asistencia sanitaria, factores ligados con el tratamiento en conjunto al paciente y entorno en el cual se desempeña el individuo, por tal motivo la participación de la familia o comunidad es sumamente importante en cuanto a la adherencia correspondiente al tratamiento del adulto mayor [15].

El objetivo de la investigación fue analizar la adherencia, el uso de medicamentos y el estado de salud de los adultos mayores del municipio de Acacías (Colombia); esta investigación hace parte del macroproyecto *Caracterización, social, demográfica y de salud del adulto mayor de cuatro municipios del piedemonte del departamento del Meta*, aprobado por la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de los Llanos y responde a la línea de salud pública de la Facultad de Ciencias de la Salud.

METODOLOGÍA

Estudio descriptivo de corte transversal con variables cuantitativas. La población estuvo comprendida por todos los adultos mayores que participaban en los programas de los Centros Vida del Municipio de Acacías, Meta con una cobertura de 150 para 2017. El muestreo fue no probabilístico discrecional, es decir, se seleccionaron las personas que asistieron al programa un día en particular, $n=96$, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: mayor de 60 años, activo en el Centro Vida, tener un estado de salud mental favorable y aceptar el consentimiento informado.

Los instrumentos utilizados fueron: miniexamen cognoscitivo (MEC), que tiene una fiabilidad entre 0,67-1,00 [16]. Actividades básicas de la Escala de Lawton y Brody, con una fiabilidad de 0,85 [17]. La valoración afectiva se realizó con el test de Yesavage reportado con confiabilidad para población latina de 0,72 [18]. Para conocer la adherencia al tratamiento se usó la escala de Moresby-Green con un índice de confiabilidad entre 0,64-0,83 [19, 20]. Finalmente, para valorar la comorbilidad se utilizó el índice de Charlson. El instrumento de caracterización sociodemográfica fue elaborado por los autores.

La información fue procesada en SPSS® (Statistical Product and Service Solutions) versión 20, Excel y Word. La investigación aplicó parámetros éticos contenidos en Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, además incluyó autorizaciones, aval bioético y consentimiento informado de los participantes, garantizando absoluta confidencialidad de la información y tratamiento anónimo del informante. Esta investigación siguió los principios internacionales de investigación establecidos en la declaración de Helsinki de 1975 de la Asociación Médica Mundial y contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de los Llanos.

RESULTADOS

La tabla N.º 1 evidencia el género predominante es el masculino con un 55%; edades prevalentes corresponde al rango entre los 71-80 años, respecto al nivel educativo, el 89% no cuentan con ningún tipo de estudio o cursaron primaria incompleta; el 32% viven solos, con inquilinos o desconocidos. El 25% tenían entre mediana y alta morbilidad según el índice de comorbilidad de Charlson y el 48% tenía una autopercepción de salud entre término medio y mala.

Tabla 1. Características sociodemográficas del adulto mayor.

Variables socio-demográficas (N= 96*)		N.º	%
Edad (años)	60-70	27	28
	71-80	45	47
	81-90	20	21
	91-100	4	4
Género	Masculino	53	55
	Femenino	43	45
Nivel educativo	Sin estudios o con primaria incompleta	85	89
	Primaria completa	8	8
	Secundaria	2	2
	Técnico o tecnólogo	0	0
	Universitario	1	1
Con quién vive	Familia	65	68
	Solos, inquilinos o conocidos	31	32
Morbilidad sentida	Baja	72	75
	Mediana	10	10
	Alta	14	15
Percepción de salud	Mala	13	14
	Término medio	33	34
	Buena	50	52

*Número de adultos mayores participantes en la investigación.

La tabla N.º 2 corresponde al análisis de las variables sociodemográficas en relación con la polimedición y la adherencia farmacoterapéutica. 62 adultos mayores manifestaron estar consumiendo medicamentos. El rango de edades prevalentes para polimedición y no adherencia farmacoterapéutica corresponde de los 71-80 con un 26%. 34% de las mujeres reportaron no adherencia farmacológica frente a la prevalencia de polimedición en los hombres con 29%. El 52% de adultos mayores no adherentes no tenían estudios o cursaron primaria incompleta. El 24% viven solos, con inquilinos o conocidos clasificados como no adherentes según el test de Morisky Green. El 30% presenta comorbilidad sentida de término medio y con factor de polimedición. El 46% tenía una autopercepción de salud media y mala y el 48% no son adherentes a su medicación.

Tabla 2. Análisis de las variables sociodemográficas en relación con la polimedicación y la adherencia farmacoterapéutica.

Variables socio-demográficas (N= 62*)		Polimedicados (%)		Total (%)	Adherente (%)		Total (%)
		Sí	No		Sí	No	
Edad	60-70	15	15	29	5	24	29
	71-80	26	19	45	19	26	45
	81-90	16	8	24	13	11	24
	91-100	0	2	2	0	2	2
Género	Masculino	29	19	48	19	29	48
	Femenino	27	24	52	18	34	52
Nivel educativo	Sin estudios o con primaria incompleta	48	37	85	34	52	85
	Primaria completa	6	5	11	2	10	11
	Secundaria	0	2	2	0	2	2
	Técnico o tecnólogo	0	0	0	0	0	0
	Universitario	2	0	2	2	0	2
Con quién vive	Familia	34	29	63	24	39	63
	Solos, inquilinos o conocidos	23	15	37	13	24	37
Morbilidad sentida	Baja	27	37	65	24	40	65
	Mediana	15	2	16	5	11	16
	Alta	15	5	19	8	11	19
Percepción de salud	Mala	11	6	18	3	15	18
	Término medio	31	18	48	19	29	48
	Buena	15	19	34	15	19	34

*Número de adultos mayores que consumen medicamentos.

En la tabla N.º 3 se indica que el 29% estaban polimedicados y no eran adherentes al tratamiento farmacológico, además padecían algún tipo de deterioro cognoscitivo y el 19% experimentaba algún tipo de condición depresiva y no eran adherentes a su farmacoterapia.

Tabla 3. Interpretación de datos valoración MEC y depresión (test de Yesavage) con índices de polimedición y adherencia farmacoterapéutica.

Instrumento (N=62*)		Polimedicionado (%)		Total (%)	Adherente (%)		Total (%)
		Sí	No		Sí	No	
Valoración miniexamen cognoscitivo (MEC)	Normalidad	27	19	47	13	34	47
	Algún tipo de déficit cognitivo	29	24	53	24	29	53
Valoración test de Yesavage	Normal	37	34	71	27	44	71
	Probable depresión	18	6	24	8	16	24
	Depresión establecida	2	3	5	2	3	5

*Número de adultos mayores que consumen medicamentos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La investigación reportó más presencia de hombres con un 55%, coherente con estudios como el de Sánchez *et al.* [21] donde se reporta un 56% de varones, sin embargo, en estudios colombianos se reporta más presencia de mujeres que de hombres [22, 23]. Con relación al rango edad, el 47% estaba entre los 71-80 años, situación similar a otros estudios como el de Velázquez *et al.* [8], Núñez *et al.* [13], quienes reportaron más del 50% de adultos mayores entre ese rango de edades, esto lleva a pensar en el incremento de la esperanza de vida en los países de América Latina [23, 24]. Ahora bien, 89% de los participantes eran analfabetas. El analfabetismo es un factor de riesgo relacionado con el tema de la adherencia reportado por Bello, Angulo, Ariel *et al.* [25-27], es decir, hay una relación entre analfabetismo y la no adherencia terapéutica por parte de los adultos mayores.

La polifarmacia a nivel mundial es un problema de salud pública que afecta gran parte la población geriátrica. En la investigación se evidenció que hay polimedición en 57% de los adultos mayores; en otros estudios se reportó 66,7% [8] y 85% [13], respectivamente. Las edades donde se presenta más polimedicionados son 71-80 años, sin embargo, se observa más adherencia en este grupo de edad; indicando que la enfermedad prevalente es la hipertensión arterial, de acuerdo con Velásquez *et al.* que reportaron 82,7%, con mayor consumo de medicamentos antihipertensivos en un 84,7% [8]. El índice de no adherencia encontrado en la investigación es del 63% asociado con un 89% de analfabetismo, similar a lo encontrado en algunos estudios reportados con cifras superiores

al 50% [8, 13,25-27]. El sexo con mayor adherencia fueron los hombres, teniendo un mayor cumplimiento farmacoterapéutico, lo que está en la misma línea con otros estudios [25, 28], donde las mujeres fueron menos adherentes. El estudio reportó que el 39% de los adultos mayores vivían con algún integrante de la familia y no son adherentes; estudios similares indican que un factor de no adherencia es estar solos [29], lo que conlleva a olvido en el consumo del medicamento y el incumplimiento en los horarios.

De acuerdo con la autopercepción de salud, el 44% de los pacientes no adherentes reportan su autopercepción de salud como de término medio y también mala, lo cual pone en declive lo mencionado anteriormente y, que además, corroborado con otros estudios, como el de Rodríguez *et al.*, se encuentran cifras similares como factores influyentes [30].

De acuerdo con las cifras de depresión geriátrica reportadas, en la literatura, se demostró que hay incidencia de la misma en adultos mayores [7, 31-33], los factores de riesgo que se asocian con la depresión son: el estado civil, la edad y el nivel educativo influyen [34], datos que se corroboran en la presente investigación donde el 29% de la población objeto de estudio refiere algún tipo de condición depresiva y de los cuales el 19% no son adherentes, justificando de tal modo que la condición depresiva predispone al paciente a no cumplir con los horarios de sus medicamentos, caso que se reporta también por medio de la revisión sistemática elaborada por Robin *et al.* [35], quienes concluyeron que en comparación con los pacientes no deprimidos, las probabilidades de que no se cumplan con las especificaciones de su tratamiento farmacológico son superiores en los adultos mayores con algún tipo de condición depresiva.

Por otro lado, se obtuvieron resultados del estado cognitivo en los adultos mayores, el 53% de los pacientes que consumían medicamentos tenían algún tipo de deterioro cognitivo. En otros estudios como el de Fernández *et al.* [36], quienes reportaron 37% de adultos mayores con deterioro cognitivo. Leiton-Espinoza *et al.* reportaron un 6,7% con deterioro cognitivo, incluyendo su influencia en la adherencia farmacológica, y presentando a su vez los índices de depresión y el comportamiento dentro de la adherencia farmacoterapéutica [37]. El estado depresivo, la comorbilidad y la polifarmacia son factores de riesgo de la adherencia terapéutica y deben ser valorados en el adulto mayor [38], esto hace parte de una evaluación geriátrica completa de la cual pende la obtención de una perspectiva completa de la salud del adulto mayor.

CONCLUSIONES

La adherencia farmacoterapéutica es un factor importante que contribuye de manera directa y específica en la mejora del estado de salud del paciente; la presente investigación mostró que hubo un alto índice de no adherencia en la población objeto de estudio y esto está relacionado con las diversas condiciones de salud que predisponen al adulto mayor a una vulnerabilidad en el consumo inadecuado de su tratamiento farmacológico. De otro lado, cabe destacar que una anamnesis completa de los factores de riesgo y de salud en la población geriátrica es fundamental para detectar de manera temprana las diversas patologías que afectan la calidad y el estado de salud del adulto mayor, minimizando el impacto en cifras de polimedicación y, por ende, de la no adherencia a los medicamentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los adultos mayores de los Centros Vida, al municipio de Aca-cías, Meta y sus colaboradores, a la Universidad de los Llanos y al Grupo de investigación GESI, por su apoyo durante la investigación.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores no declaran conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud y Protección Social, *Envejecimiento y vejez*, URL: <https://www.minsalud.gov.co/proteccionsocial/promocion-social/Paginas/envejecimiento-vejez.aspx>, consultado en noviembre de 2020.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Envejecimiento y salud*, URL: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud>, consultado en noviembre de 2020.
3. V.N. Salgado de Snyder, R. Wong, Género y pobreza: determinantes de la salud en la vejez, *Salud Pública de México*, 49(Supl. 4), S515-S521 (2007).
4. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*, Ediciones de la OMS, Ginebra, Suiza, 2015.

5. Organización Mundial de la Salud (OMS), *10 datos sobre el envejecimiento*, URL: <http://www.who.int/features/factfiles/ageing/es/>, consultado en noviembre de 2020.
6. P. Osorio, Exclusión generacional: la tercera edad, *Revista Mad*, **14**, 47-52 (2006).
7. M. Sarro Maluqer, A. Ferrer Feliu, Y. Rando Matos, F. Formiga, S. Rojas-Farreras, Depresión en ancianos: prevalencia y factores asociados, *Semergen*, **39**(7), 345-402 (2013).
8. L. Velázquez-Portillo, R. Gómez-Guerrero, Frecuencia y factores asociados al empleo de polifarmacia en pacientes hospitalizados en el servicio de urgencias, *Revista Mexicana de Medicina de Urgencias*, **3**(2), 49-54 (2011).
9. D. Cardona-Arango, A. Segura-Cardona, M. Garzón-Duque, A. Segura-Cardona, S.M. Cano-Sierra, Estado de salud del adulto mayor de Antioquia, Colombia, *Revista Brasileira de Geriatria y Gerontologia*, **19**(1), 71-86 (2016).
10. B. Manrique-Espinoza, A. Salinas-Rodríguez, K.M. Moreno-Tamayo, I. Acosta-Castillo, A.L. Sosa-Ortiz, L.M. Gutiérrez-Robledo, M. Téllez-Rojo, Condiciones de salud y estado funcional de los adultos mayores en México, *Revista de Salud Pública de México*, **55**(2), 323-331 (2013).
11. R.G. Cervantes-Becerra, E. Villarreal-Ríos, L. Galicia-Rodríguez, E.R. Vargas-Daza, L. Martínez-González, Estado de salud en el adulto mayor en atención primaria a partir de una valoración geriátrica integral, *Atención Primaria*, **47**(6), 329-335 (2015).
12. J.A. Castro, J.P. Orozco, D.S. Marín, Polifarmacia y prescripción de medicamentos potencialmente no apropiados en ancianos, *Revista Médica de Risaralda*, **22**(6), 52-57 (2016).
13. A.J. Núñez-Montenegro, A. Montiel-Luque, E.M. Auriolles, B. Torres-Verdú, C. Lara-Moreno, J.A. González-Correa, Adherencia al tratamiento en pacientes polimedicados mayores de 65 años con prescripción por principio activo, *Atención Primaria*, **46**(5), 238-245 (2014).
14. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Adherencia a los tratamientos a largo plazo*, URL: <http://www.farmacologia.hc.edu.uy/images/WHO-Adherence-Long-Term-Therapies-Spa-2003.pdf>, consultado en noviembre de 2020.

15. J.M. Ribera-Casado, *Adherencia al tratamiento*, Simposio Internacional: Longevidad y comportamiento: ¿Es el comportamiento un factor interviniente en la longevidad?, Madrid, 1 y 2 de marzo, 2018.
16. C. Buizza, A. Navarro, U. Díaz-Orueta, M.F. González, J. Álaba, E. Arriola, C. Hernández, A. Zulaica, J.J. Yanguas, Evaluación breve del estado cognitivo de la demencia en estadios avanzados: resultados preliminares de la validación española del *Severe Mini-Mental State Examination*, *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, **46**(3), 117-180 (2011).
17. Vithas NeuroRHB, *Actividades instrumentales de la vida diaria*, URL: <https://neurorhb.com/blog-dano-cerebral/actividades-instrumentales-de-la-vida-diaria/>, consultado en Octubre de 2018.-
18. A.M. Bacca, A. González, A.F. Uribe-Rodríguez, Validación de la escala de depresión de Yesavage (versión reducida) en adultos mayores Colombianos, *Revista Pensamiento Lógico*, **1**(4), 53-63 (2005).
19. D.E. Morisky, A. Ang, M. Krousel-Wood, H.J. Ward, Predictive validity of a medication adherence measure in an outpatient setting, *The Journal of Clinical Hypertension* (Greenwich), **10**(5), 348-354 (2008).
20. F. Valencia-Monsalvez, S. Mendoza-Parra, L. Luengo-Machuca, Evaluación de la escala Morisky de adherencia a la medicación (MMAS-8) en adultos mayores de un centro de atención primaria en Chile, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, **34**(2), 245-249 (2017).
21. S. Vicente-Sánchez, R. Olmos-Jiménez, C. Ramírez-Roig, M.J. García-Sánchez, M. Valderrey-Pulido, A. de la Rubia-Nieto, Adherencia al tratamiento en pacientes mayores de 65 años que sufren reingresos precoces, *Farmacia Hospitalaria*, **42**(4), 147-151 (2018).
22. N. Guerrero, M.C. Yépez, Factores asociados a la vulnerabilidad del adulto mayor con alteraciones de salud, *Universidad y Salud*, **17**(1), 121-131 (2014).
23. R.F. Cuadros-Cuadros, *Polifarmacia en una población institucionalizada en Cundinamarca*, Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2013, p. 73.
24. J. L. Martínez-Arroyo, A. Gómez-García, D. Saucedo-Martínez, Prevalencia de la polifarmacia y la prescripción de medicamentos inapropiados en el adulto

- mayor hospitalizado por enfermedades cardiovasculares, *Gaceta Médica de México*, **150**(1), 29-38 (2014).
25. N.V. Bello-Escamilla, P.A. Montoya-Cáceres, Adherencia al tratamiento farmacológico en adultos mayores diabéticos tipo 2 y sus factores asociados, *Gerokomos*, **28**(2), 73-77 (2017).
 26. I.J. Ángulo-Prado, V.I. Benítez-Segura, N.Y. Coral-Bernal, I.L. Pauta-Ortega, A.M. Rodríguez-Díaz, *Factores asociados a la adherencia al tratamiento farmacológico en pacientes con hipertensión arterial que asisten a consulta médica de primer nivel de atención en tres municipios del departamento de Nariño y un municipio de Putumayo*, Trabajo final de especialización, Universidad CES Medellín, San Juan de Pasto, 2015, p. 47.
 27. A. Salcedo-Barajas, A.M. Gómez-Ochoa, Grados de riesgo para la adherencia terapéutica en personas con hipertensión arterial, *Avances en Enfermería*, **32**(1), 33-43 (2014).
 28. Y. Valdés-Naranjo, O. Pantaleón-Bernal, M. Quiñones-Castro, Adherencia al tratamiento anticoagulante oral por enfermedad tromboembólica venosa en adultos mayores, *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat*, **18**(1), 19-34 (2017).
 29. E. Ruiz-García, F. Pérez-García, Adherencia en pacientes ancianos polimeditados usuarios de receta electrónica, *Farmacéuticos Comunitarios*, **6**(Supl. 1) (2014).
 30. M.A. Rodríguez-Chamorro, E. García-Jiménez, E.M. Pérez-Merino, P. Amariles, F. Martínez, M.J. Faus-Dader, Influencia de las características sociodemográficas y clínicas en la adherencia al tratamiento farmacológico de pacientes con riesgo cardiovascular, *Pharmaceutical Care España*, **14**(4), 138-145 (2012).
 31. I.M.P. Galván-Nava, *Auditoría farmacoterapéutica en pacientes derechohabientes geriátricos que reciben medicamentos controlados en el Hospital Universitario de Puebla, México*, Trabajo de grado, Benémérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 2015, p.50.
 32. M. Valdés-King, J.A. González-Cáceres, M. Salisu-Abdulkair, Prevalencia de depresión y factores de riesgo asociados a deterioro cognitivo en adultos mayores, *Revista Cubana de Medicina General Integral*, **33**(4), 1-15 (2017).

33. E. Márquez-Cardoso, S. Soriano-Soto, A. García-Hernández, M.P. Falcón-García, Depresión en el adulto mayor: frecuencia y factores de riesgo asociados, *Atención Primaria*, **36**(6), 293-352 (2005).
34. A. Segura-Cardona, D. Cardona-Arango, A. Segura-Cardona, M. Garzón-Duque, Riesgo de depresión y factores asociados en adultos mayores, Antioquia, Colombia, 2012, *Revista de Salud Pública*, **17**(2), 184-194 (2015).
35. M.R. DiMatteo, H.S. Lepper, T.W. Croghan, Depression is a risk factor for non-compliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence, *Archives of Internal Medicine*, **160**(14), 2101-2107 (2000).
36. L.C. Fernández-Lisón, B. Barón-Franco, B. Vásquez-Domínguez, T. Martínez-García, J.J. Urendes-Haro, E. Pujol de la Llave, Errores de medicación e incumplimiento terapéutico en ancianos polimedicados, *Farmacia Hospitalaria*, **30**(5), 280-283 (2006).
37. Z.E. Leiton-Espinoza, E. Fajardo-Ramos, F.M. Victoria-Mori, Caracterización del estado de salud de los adultos mayores en la región La Libertad (Perú), *Salud Uninorte, Barranquilla (Col.)*, **33**(3), (2017).
38. M.L. Peralta, P. Carbajal-Pruneda, Adherencia al tratamiento, *Revista del Centro Dermatológico Pascua*, **17**(3), 84-88 (2008).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

S.A. Polanco-Leal, I.Z. Rivera-Gutiérrez, E. Salamanca-Ramos, Z. Velasco-Páez, Características de salud y adherencia farmacoterapéutica en el adulto mayor del municipio de Acacias (Colombia), *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 325-338 (2021).

Desarrollo tecnológico e introducción del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el cuadro básico de medicamentos nacional de Cuba

Nancy Burguet-Lago¹, Yénilen Troche-Concepción¹, Leisy Baró-Rodríguez¹, María Victoria Martínez-Betancourt², Griset Toledo-Carrabeo¹

¹Empresa Laboratorios Aica, Unidad de Desarrollo e Innovación, Departamento de I+D, Av. 39a N.º 4602 e/ 46 y 48, Playa. La Habana, Cuba.

*Correo electrónico: nburguet@aica.cu

²Empresa Laboratorios Aica, Departamento de Aseguramiento y Control de la Calidad, Av. 23 e/268 y 270. San Agustín. La Lisa. La Habana.

Recibido: 14 de noviembre de 2020

Revisado: 27 de enero de 2021

Aceptado: 28 de enero de 2021

RESUMEN

Introducción: el inyectable succinilcolina 50 mg/mL se utiliza para intubaciones traqueales rápidas. **Objetivo:** desarrollar e introducir el inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el cuadro básico de medicamentos. Tres variantes de formulación fueron diseñadas: dos con preservantes antimicrobianos y presentación (bulbos 6R y 10R) y una sin preservantes (bulbos 6R). **Metodología:** se validaron los métodos empleados para el control de calidad y estabilidad. A los lotes elaborados a escala de laboratorio, piloto e industrial con la fórmula seleccionada se les realizó estudio de estabilidad acelerada y vida útil. Las variantes diseñadas evidenciaron adecuada calidad, la no preservada fue seleccionada para realizar lotes a diferentes escalas. Las técnicas cromatográficas empleadas para la cuantificación de la succinilcolina cumplieron con los criterios de validación establecidos. **Resultados:** se demostró el desempeño de las pruebas de esterilidad y ensayo de endotoxinas bacterianas. El producto en estudio de estabilidad indicó un adecuado comportamiento físico, químico y microbiológico durante el período evaluado. Se comprobó la factibilidad del desarrollo tecnológico, con la fórmula seleccionada para el inyectable succinilcolina 50 mg/mL. Se introdujo el inyectable en el cuadro básico de medicamentos nacional.

Palabras clave: Succinilcolina, inyectable, desarrollo.

SUMMARY

Technological development and introduction of the injectable succinylcholine 50 mg/mL in the basic table of national medicines of Cuba

Introduction: the injectable succinylcholine 50 mg/mL is used for rapid tracheal intubations. **Aim:** to develop and introduce the injectable succinylcholine 50 mg/mL into the basic drug table. Three formulation variants were designed: two with antimicrobial and presentation preservatives (6R and 10R bulbs) and one unpreserved (6R bulbs). **Methodology:** the methods used for quality control and stability were validated. Laboratory, pilot and industrial-scale batches with the selected formula were studied for accelerated stability and service life. The designed variants showed adequate quality, selecting the non-preserved, to make batches at different scales. Chromatographic techniques used for the quantification of succinylcholine met established validation criteria. **Results:** the performance of sterility tests and bacterial endotoxin testing was demonstrated. The product under stability study indicated adequate physical and chemical behavior during the period evaluated. The feasibility of technological development was verified, with the formula selected for the injectable succinylcholine 50 mg/mL. Injectable was introduced in the national medicines basic table.

Keywords: Succinylcholine, injectable, development.

RESUMO

Desenvolvimento tecnológico e introdução da succinilcolina injetável 50 mg/mL na mesa da medicina básica de Cuba

Introdução: a succinilcolina injetável 50 mg/mL é utilizada para intubações traqueais rápidas. **Objetivo:** desenvolver e introduzir a succinilcolina injetável 50 mg/mL na tabela básica de medicamentos. Três variantes de formulação foram projetadas: duas com conservantes antimicrobianos e apresentação (lâmpadas 6R e 10R) e uma sem conservantes (lâmpadas 6R). **Metodologia:** foram validados os métodos utilizados para o controle de qualidade e estabilidade. Estudos acelerados de estabilidade e vida de prateleira foram realizados nos lotes produzidos em escala laboratorial, piloto e industrial com a fórmula selecionada. As variantes projetadas apresentaram qualidade adequada, a não preservada foi selecionada para a realização de lotes em diferentes escalas. As técnicas cromatográficas utilizadas para a quantificação da succinilcolina atenderam aos critérios de validação estabelecidos. **Resultados:** foi demonstrado

o desempenho dos testes de esterilidade e do ensaio de endotoxinas bacterianas. O produto em estudo de estabilidade indicou comportamento físico, químico e microbiológico adequado durante o período avaliado. Foi verificada a viabilidade do desenvolvimento tecnológico, com a fórmula selecionada para a succinilcolina injetável 50 mg/mL. O injetável foi introduzido na tabela nacional de medicamentos básicos.

Palavras-chave: Succinilcolina, injetável, desenvolvimento.

INTRODUCCIÓN

La succinilcolina o suxametonio es un agente bloqueador neuromuscular despolarizante de acción ultracorta que se usa en anestesiología para facilitar la intubación traqueal y la ventilación mecánica [1, 2], que posibilita la reducción de la intensidad de las contracciones musculares producidas por medios farmacológicos o eléctricos [3-7]. Entre todos los bloqueadores neuromusculares, este muestra un inicio de acción de menor tiempo y un tiempo de recuperación rápido [8]. Se presenta como cloruro de succinilcolina o cloruro de suxametonio, en la bibliografía aparecen reportados los productos comerciales Anectine® y Mioflex® [9, 10].

En Cuba, la producción del medicamento succinilcolina (de concentración de dosis 50 mg/mL) en forma de inyección IM e IV se realiza en la unidad empresarial de base (UEB) de los Laboratorios Liorad; con presentación en bulbos de vidrio incoloro 20R, que en su formulación contiene alcohol bencílico como preservante [11]. Este medicamento tiene gran demanda por su uso en los procesos quirúrgicos [8, 11]. En visitas de poscomercialización realizadas a centros hospitalarios en distintas regiones del país (zona occidental, central y oriental), los especialistas en anestesiología plantearon que la presentación actual en bulbos 20R conlleva a desechar una porción del producto, lo que trae como consecuencia pérdidas económicas [12]. Actualmente, el Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D) trabaja en un proyecto para el rediseño de la formulación de este inyectable como parte de la mejora continua de calidad del producto. Para el desarrollo del medicamento se tuvo en cuenta la formulación, Anectine®, (GlaxoSmithKline, S.A., España) y los resultados obtenidos en la solución inyectable succinilcolina 100 mg para uso infantil [13], que es un producto de nueva introducción en el cuadro de medicamentos nacional por la UEB de Laboratorios Liorad. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar e introducir el inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el cuadro básico de medicamentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desarrollo de la formulación de succinilcolina 50 mg/mL

Se empleó para el desarrollo de la formulación el ingrediente farmacéutico activo (IFA) cloruro de succinilcolina del fabricante Micro Orgo Chem, India. Se estudiaron diferentes variantes de formulación con concentración de dosis 50 mg/mL, la primera y la segunda que contenían el IFA, los preservantes antimicrobianos (metilparabeno y propilparabeno, mezclados de 85 a 95 °C y posterior disminución de la temperatura de la mezcla de 25 a 35 °C antes de incorporar el IFA) y agua para inyección (API) como vehículo. Estas se envasaron en dos formatos diferentes de viales, 6R y 10R para evaluar dos presentaciones (1 y 2). Se elaboró una tercera variante que contenía el IFA, el API y sin preservantes antimicrobianos en su formulación, y se envasó en formato 6R, tomando como referencia la literatura consultada (Anectine®, GlaxoSmithKline, S.A. España) y los resultados obtenidos de forma previa en el desarrollo de la succinilcolina infantil 100 mg [13], registrado y comercializado por la UEB de Laboratorios Liorad e introducido en el cuadro básico de medicamentos nacional; también se estudió una formulación sin el uso del alcohol bencílico como preservante antimicrobiano.

Se analizó la influencia de los componentes y el envase sobre el contenido del fármaco durante 30 días, para lo cual se colocaron muestras a temperaturas entre 2 y 8 °C (estabilidad vida estante) y de 25 ± 2 °C, con humedad relativa de $60 \pm 5\%$ (estudio de estabilidad acelerado) [14].

Elaboración de lotes a escala de laboratorio de la formulación seleccionada

Se seleccionó la variante sin preservante para realizar tres lotes a escala de laboratorio (1,5 L cada uno), cumpliendo con las buenas prácticas de fabricación (BPF) de medicamentos [15, 16]. A los tres lotes recién elaborados se les realizaron los ensayos de control de calidad según se indica en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), del año 2015 [17].

Evaluación del desempeño de las técnicas de análisis

Se definieron como técnicas de análisis los ensayos: características organolépticas, identificación (ensayo por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y cromatografía en capa delgada), determinación de pH, partículas materiales, conteo de partículas en solución, determinación de endotoxinas bacterianas y el ensayo de esterilidad, según lo descrito en la USP [17]. Para analizar la valoración del IFA en el producto terminado se tuvo en cuenta lo que plantea el anexo N. °1 de las buenas

prácticas para laboratorio de control de medicamentos del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed); con respecto a la validación de los métodos analíticos [18].

Esterilidad. Se realizó por el método de filtración por membrana, determinándose el volumen de lavado a emplear durante la ejecución del ensayo [17]. Se verificó que los lotes analizados no presentaron crecimiento microbiano en ninguno de los medios ensayados (cumpliendo la condición de estéril).

Determinación de endotoxinas bacterianas. El método empleado fue el del lisado de amebocitos del *limulus* (LAL) en su variante cromogénica cinética. El límite (no más que 2,0 UE/mg) aparece reportado en la farmacopea. Se definió la máxima dilución válida, se realizó la caracterización del producto para definir la dilución de trabajo y validar la dilución seleccionada [17].

Valoración del IFA (cloruro de succinilcolina) en el producto terminado. Se realizó la cuantificación directa del IFA contra una sustancia de referencia. Se consideraron valores adecuados en el rango de 90% a 110,0 % [17]. La evaluación del desempeño del método fue realizada por CLAR [18], con una columna de 4 mm x 25 cm, rellena con material L3, con una velocidad de flujo de aproximadamente 0,75 mL/min y detector a 214 nm.

Estudios de estabilidad a los lotes elaborados a escala de laboratorio

Se evaluó la estabilidad en vida estante y en condiciones aceleradas de succinilcolina 50 mg/mL (lotes de laboratorio). El estudio de estabilidad se realizó por hasta 150 días [14].

Elaboración de los lotes a escala piloto

Una vez culminado el estudio de estabilidad de los lotes a escala de laboratorio se procedió a realizar el escalado de tres lotes pilotos en la planta de producción con esta formulación. Estos se elaboraron cumpliendo con las BPF [15, 16].

Análisis del producto terminado

A los tres lotes pilotos recién elaborados se les realizaron los ensayos de control de calidad según la monografía de la farmacopea (USP 38).

Estudios de estabilidad

El estudio de estabilidad de los lotes pilotos se realizó en vida estante a temperaturas de 2 a 8 °C durante 12 meses y en condiciones aceleradas de 25 ± 2 °C y humedad relativa

de $60 \pm 5\%$ hasta los 6 meses. Los parámetros evaluados en ambos estudios fueron los mencionados con anterioridad para los lotes a escala de laboratorio [14].

Lotes industriales

Al culminar los estudios de estabilidad de los lotes pilotos se presentó la solicitud de inscripción de la nueva formulación a la autoridad reguladora nacional (Cecmed), cumpliendo con los requisitos exigidos en la Regulación 61 del año 2012 [19].

RESULTADOS

En el desarrollo de la formulación, los resultados de valoración (contenido del IFA) y pH de las tres variantes ensayadas durante 30 días de estudio de estabilidad (vida estante y acelerada), se mantuvieron dentro de los límites establecidos [17]. La variante 3 en el tiempo de estudio mostró menos variabilidad en los resultados de pH y contenido de IFA tanto en el estudio realizado en vida estante, como en el estudio acelerado. Esto se tuvo en cuenta para la selección de la variante a emplear en la elaboración de los lotes a escala de laboratorio.

Al evaluar las características organolépticas, el pH inicial antes del ajuste y luego del enrase y la carga microbiana; en el control inicial de los lotes de laboratorio, cumplieron con los límites que se especificaron.

En esta etapa se definieron los puntos críticos del proceso tecnológico y se estableció el procesamiento aséptico para su elaboración y la filtración esterilizante [15].

En la evaluación del desempeño de las técnicas de análisis se determinó para realizar el ensayo de esterilidad del producto succinilcolina 50 mg/mL, un volumen de lavado de 400 mL de agua peptonada, a una concentración de 1 g/L [15, 17]. En la determinación de endotoxinas bacterianas, durante el ensayo de interferencia realizado a los tres lotes del producto a escala de laboratorio, se determinó la dilución a la cual el producto no mostraba interferencias con el método de ensayo (dilución 1/100) [17]. Los ensayos de validez, donde se retó la dilución de trabajo seleccionada con el reactivo LAL, mostraron que las muestras ensayadas cumplieron con el límite de endotoxinas bacterianas establecido (2,0 UE/mg). Se evaluó el desempeño del método cromatográfico para la cuantificación del IFA, de acuerdo con lo establecido en el anexo 1 del Cecmed: validación de métodos analíticos. Se fijaron las condiciones cromatográficas del ensayo [18].

El estudio de estabilidad (vida de estante y acelerado) realizado a los lotes elaborados a escala de laboratorio durante 150 días se muestran en las tablas 1 y 2. Todos los lotes cumplieron con los límites establecidos para cada ensayo realizado en las condiciones de temperatura de 2-8 °C. Los lotes almacenados a 25 ± 2 °C y $60 \pm 5\%$ de humedad relativa también cumplieron con las especificaciones de calidad durante el período evaluado, según se aprecia en la tabla 2. Los resultados obtenidos de los lotes piloto recién elaborados se muestran en la tabla 3.

Tabla 1. Estudio de estabilidad vida estante de los lotes de laboratorio.

Tiempo (días)	Características organolépticas	pH (3,0-4,5)	IFA ^a (90,0 %-110,0 %)	LAL ^b (2,0 UE/mg)	CP ^c ($\geq 10 \mu\text{m}/\geq 25 \mu\text{m}$)	Estéril
Lote 1						
0	Cumple	4,0	102,7	0,01	410 / 40	Sí
7	Cumple	4,1	101,4	-	-	-
15	Cumple	4,0	103,5	-	-	-
21	Cumple	3,9	103,3	-	-	-
30	Cumple	3,8	102,1	-	-	-
150	Cumple	3,9	101,9	-	-	-
Lote 2						
0	Cumple	4,0	104,6	0,01	201 / 5	Sí
7	Cumple	3,9	103,1	-	-	-
15	Cumple	4,0	104,3	-	-	-
21	Cumple	3,8	103,5	-	-	-
30	Cumple	3,6	103,3	-	-	-
150	Cumple	3,7	103,6	-	-	-
Lote 3						
0	Cumple	4,0	101,7	0,01	107 / 10	Sí
7	Cumple	4,0	103,6	-	-	-
15	Cumple	4,1	103,5	-	-	-
21	Cumple	3,9	103,1	-	-	-
30	Cumple	3,8	103,2	-	-	-
150	Cumple	3,8	104,6	-	-	-

^a Ingrediente farmacéutico activo, ^b Lisado de amebocitos del *Limulus*, ^c Conteo de partículas. Características organolépticas: líquido transparente e incoloro, libre de partículas visibles.

Tabla 2. Estudio de estabilidad acelerado de los lotes de laboratorio.

Tiempo (días)	Características organolépticas	pH (3,0-4,5)	IFA ^a (90,0 %-110,0 %)	LAL ^b (2,0 UE/mg)	CP ^c ($\geq 10 \mu\text{m}$ / $\geq 25 \mu\text{m}$)	Estéril
Lote 1						
0	Cumple	3,9	99,8	0,01	670 / 40	Sí
7	Cumple	3,9	99,7	-	-	-
15	Cumple	3,6	100,8	-	-	-
21	Cumple	3,9	100,4	-	-	-
30	Cumple	3,9	100,0	-	-	-
150	Cumple	3,6	97,6	-	-	-
Lote 2						
0	Cumple	3,8	98,8	0,01	360 / 10	Sí
7	Cumple	3,9	101,9	-	-	-
15	Cumple	3,8	100,4	-	-	-
21	Cumple	3,8	100,4	-	-	-
30	Cumple	3,8	100,0	-	-	-
150	Cumple	3,6	97,9	-	-	-
Lote 3						
0	Cumple	3,8	97,3	0,01	304 / 6	Sí
7	Cumple	3,8	99,2	-	-	-
15	Cumple	3,8	99,2	-	-	-
21	Cumple	3,8	98,7	-	-	-
30	Cumple	3,8	97,9	-	-	-
150	Cumple	3,6	98,7	-	-	-

^a Ingrediente farmacéutico activo, ^b Lisado de amebocitos del *Limulus*, ^c Conteo de partículas.

Características organolépticas: líquido transparente e incoloro, libre de partículas visibles.

Una vez concedido el certificado de registro sanitario [20], por el CECMED, y realizadas las transferencias tecnológica y analítica fueron elaborados los tres primeros lotes a escala industrial, con sus correspondientes controles de calidad y se elaboró el protocolo para evaluar la estabilidad de estos.

Tabla 3. Resultados del control de calidad (lotes pilotos).

Ensayos/lotes		1	2	3
Características organolépticas (líquido transparente e incoloro, libre de partículas visibles)		Cumple	Cumple	Cumple
Identificación	CLAR ^a	Cumple	Cumple	Cumple
	CCD ^b	Cumple	Cumple	Cumple
pH (3,0 - 4,5)		3,7	3,7	3,7
Volumen (≥ 5 mL)		5,4	5,5	5,5
Valoración (90,0-100,0 %)		99,2	99,9	99,6
Conteo de partículas	$\geq 10 \mu\text{m}$ (≤ 6000)	30	35	34
	$\geq 25 \mu\text{m}$ (≤ 600)	0	0	0
Esterilidad		Cumple	Cumple	Cumple
Endotoxinas bacterianas (2,0 UE/mg)		0,15	0,16	0,22

^a Cromatografía líquida de alta resolución, ^b Cromatografía en capa delgada.

DISCUSIÓN

El IFA cumplió con los requisitos de calidad requeridos para ser utilizado en el diseño de la formulación y el proceso tecnológico para la fabricación del producto terminado, succinilcolina 50 mg/mL.

En los estudios realizados en la etapa de formulación de las tres variantes se pudo constatar que en todos los casos cumplieron con los límites establecidos, lo que muestra que, ni el envase empleado ni los componentes de las formulaciones interfirieron con los resultados (no influyeron sobre el contenido del fármaco); por lo que se hubiese podido seleccionar cualquiera de las tres variantes ensayadas.

La formulación a escala de laboratorio compuesta por el cloruro de succinilcolina (50 mg/mL), sin preservante y con agua para inyección como vehículo resultó adecuada ya que se obtuvo un producto acorde con las especificaciones de calidad establecidas. Esto permite afirmar que es posible obtener el inyectable en solución acuosa de succinilcolina.

Los métodos de análisis oficiales utilizados resultaron adecuados para el control de calidad y los estudios de estabilidad del inyectable reformulado. La técnica de análisis diseñada para la valoración del contenido del IFA resultó apropiada para el control del proceso de producción al ser un método específico, preciso y exacto. La dilución de

trabajo (ensayo de endotoxinas bacterianas) y el volumen de lavado de agua peptona (ensayo de esterilidad) fueron las condiciones establecidas para la realización de los ensayos de rutina; para la liberación de los lotes del producto terminado de succinilcolina 50 mg/mL [16-18].

Los resultados obtenidos de los lotes a escala piloto, recién elaborados, evidencian que se trabajó bajo condiciones que garantizaron un estricto cumplimiento de las BPF, establecidas para la producción de inyectables [15, 16]. Se logró una tecnología fácilmente escalable.

El estudio de estabilidad acelerada (seis meses) y la vida estante (veinticuatro meses) permitieron evaluar la estabilidad física, química y microbiológica de la succinilcolina 50 mg/mL [15]. Además, de establecer el periodo de validez y las condiciones adecuadas de almacenamiento del producto en el envase propuesto para su comercialización. Con ello, el Cecmed otorgó el registro sanitario de medicamentos [20], con un periodo de validez de veinticuatro meses. La tecnología propuesta resultó propicia para elaborar la formulación parenteral acuosa de succinilcolina, en la UEB de Laboratorios Liorad [17].

Los lotes a escala industrial cumplieron con las especificaciones de calidad, fueron comercializados y distribuidos por el país, así se logró la introducción de este producto en el cuadro básico de medicamentos nacional [21].

CONCLUSIONES

Se demostró la factibilidad de la tecnología propuesta para elaborar una formulación parenteral en solución acuosa de succinilcolina 50 mg/mL, en las condiciones actuales de la UEB de Laboratorios Liorad y se logró la introducción de este producto en el cuadro básico de medicamentos nacional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los laboratorios de Control de la Calidad y al Departamento de Tecnología y a la Unidad Empresarial de Base de Laboratorios Liorad, de la Empresa Laboratorios Aica por la colaboración prestada.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. R. Poveda, C. Dueñas, G. Ortiz, Secuencia rápida de intubación en cuidados intensivos, *Revista Colombiana de Anestesiología*, 41(1), 24-33 (2013).
2. Infomed, Portal de Salud de Cuba, Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, La Habana, URL: <http://www.infomed.sld.cu/>, consultado en noviembre de 2019.
3. S. Blanco, M. Andresen, Relajantes musculares, Temas de medicina interna, Santiago de Chile Escuela de Medicina, 2001, URL: <http://publicacionesmedicina.uc.cl/TemasMedicinaInterna/index.html>, consultado en noviembre de 2017.
4. L. Higgins, Succinilcolina (suxametonio) y pseudocolinesterasa, 2013, URL: <http://www.anestesia.com.mx/art26.html>, consultado en abril de 2015.
5. S.O. Granados, Bloqueadores neuromusculares en cirugía ambulatoria, 2013, URL: <http://www.slideshare.net/SGSegovia/bloqueadores-neuromusculares-en-cirugia-ambulatoria>, consultado en febrero de 2015.
6. K. de León, Bloqueadores neuromusculares, Veracruz, Hospital General ISSSTE, 2013, URL: https://www.slideshare.net/teen_crm/bloqueadores-neuromusculares-9849075?qid=e7c7c721-ffd1-4eda-80ec-78822d6931c4&v=&b=&from_search=2, consultado en febrero de 2015.
7. Ficha Técnica Anectine 50 mg/mL solución inyectable y para perfusión, Madrid, España, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2018, URL: <http://www.aemps.gob.es>, consultado en noviembre de 2019.
8. D. Moreno, I. Cordero, I. Mora, Eficacia de tres dosis de succinilcolina en la inducción de secuencia rápida, *Revista Cubana de Anestesiología y Reanimación*, 18(1), e534 (2019).
9. Laboratorio Duncan Farmacéutica S.A., Prospecto Anectine®, Madrid, España, 2015, URL: <https://www.diagnosia.com/es/fabricante/duncan-farmaceutica-s-a>, consultado en noviembre de 2019.
10. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), *Prospecto información para el usuario Mioflex 50 mg/ml solución inyectable y para perfusión. Suxametonio, cloruro*, Madrid, España, 2014, URL: <http://www.aemps.gob.es>, consultado en noviembre de 2019.

11. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Resumen de las características del producto succinilcolina-1*, La Habana, Cuba, 2014, URL: <https://cecmed.cu/registro/rcp>, consultado en febrero de 2015.
12. N. Burguet, G. Jiménez, J.A. Trimiño, A. Campaña, Evaluación de la seguridad poscomercialización de succinilcolina-1 según las buenas prácticas de farmacovigilancia. Cuba 2009-2015, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **46**(4), 59-65 (2015).
13. N. Burguet, G. Toledo, S. Martínez, M.I. Reyes, A.E. Inganzo, Desarrollo tecnológico de succinilcolina infantil 100 mg, inyectable en solución, *Revista Cubana de Farmacia*, **49**(3), 441-448 (2015).
14. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Regulación 23-2000, Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos*, La Habana, Cuba, 2000.
15. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Resolución N.º 48/2011, Anexo N.º 04 Buenas prácticas para la fabricación de productos estériles centro para el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed)*, La Habana, Cuba, 2011.
16. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Regulación N.º 16/2012, Directrices sobre Buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos*, La Habana, Cuba, 2012.
17. *USP 38*, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2015, p. 5769.
18. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Resolución N.º 40/2014. Anexo N.º 1 De las buenas prácticas para laboratorio de control de medicamentos. validación de métodos analíticos*, La Habana, Cuba, 2014.
19. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Regulación N.º 61/2012, Requisitos para el registro sanitario de medicamentos de uso humano*, La Habana, Cuba, 2012.
20. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Cecmed), *Succinilcolina 50*, La Habana, Cuba, 2018, URL: <http://servicio>.

cecmed.cu/sicecmed/libroRegistroMedicamento/index, consultado en noviembre de 2019.

21. Dirección de Medicamentos y Tecnologías Médicas (MINSAP), *Cuadro básico de medicamentos y productos naturales*, La Habana, Cuba, , 2018, URL: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=CUADRO+B%C3%81SICO+DE+MEDICAMENTOS+Y+PRODUCTOS+NATURALES+>, consultado en noviembre de 2019.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

N. Burguet-Lago, Y. Troche-Concepción, L. Baró-Rodríguez, M. V. Martínez-Betancourt, G. Toledo-Carrabeo, Desarrollo tecnológico e introducción del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el cuadro básico de medicamentos nacional de Cuba, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 339-351 (2021).

Metabolitos secundarios aislados de especies de la familia Myristicaceae que producen inhibición enzimática

Xiomara Alejandra Cabrera Martínez*, Luis Enrique Cuca Suarez

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Grupo de Investigación Productos Naturales Vegetales, A.A. 14490, Carrera 30 N.º 45-03, Bogotá D. C., Colombia.

Autor de correspondencia: xacabreram@unal.edu.co

Recibido: 8 de septiembre de 2020

Revisado: 25 de enero de 2021

Aceptado: 29 de enero de 2021

RESUMEN

Introducción: diferentes especies de la familia Myristicaceae han sido utilizadas con fines medicinales, nutricionales e industriales, mostrando así la importancia y potencial de la familia en diversos campos. El uso medicinal ha sido primordial por diferentes comunidades indígenas y ha venido en aumento como alternativa al tratamiento de enfermedades, por lo cual la investigación se está concentrando en la medicina herbaria y plantas medicinales, siendo este el primer paso para el desarrollo e innovación de fármacos. Entre los tipos de fármacos se destacan los inhibidores enzimáticos, que actúan regulando procesos metabólicos o atacando patógenos. **Objetivos:** recopilar información de la herboristería de la familia Myristicaceae que incluya aspectos de fitoquímica, etnobotánica, usos industriales, actividad biológica y determinar posibles metabolitos secundarios que producen inhibición enzimática y actividad biológica. **Metodología:** la búsqueda de información se realizó con artículos científicos, libros especializados y tesis de grado. **Resultados y conclusiones:** se encontró que compuestos fenólicos de tipo: acilfenol, lignano, neolignano, flavonoide, alquénilfenol, tocotrienol y ácido fenólico producen inhibición enzimática. Los compuestos fenólicos identificados en especies de la familia Myristicaceae son una fuente promisoría de metabolitos que producen inhibición enzimática. Siendo los metabolitos de tipo lignanos los que presentaron mayor número de estudios de inhibición enzimática. La información analizada puede servir de base para el desarrollo de investigaciones de relación estructura actividad y/o acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios y enzimas inhibidas, con especies de la familia Myristicaceae.

Palabras clave: Myristicaceae, actividad enzimática, compuestos fenólicos.

SUMMARY

Secondary metabolites of species of the Myristicaceae family that produce enzymatic inhibition

Introduction: Different species of the Myristicaceae family have been used for medicinal, nutritional and industrial purposes, showing the importance and potential of the family in various fields. Medicinal use has been primordial for different indigenous communities and has been increasing as an alternative for the treatment of diseases, for which research is concentrating on herbal medicine and medicinal plants, being this the first step for the development and innovation of pharmaceuticals. Among the types of drugs, enzymatic inhibitors, which act by regulating metabolic processes or attacking pathogens, stand out. **Objectives:** To gather information on the herbalism of the Myristicaceae family including aspects of phytochemistry, ethnobotany, industrial uses, biological activity and to determine possible secondary metabolites that produce enzymatic inhibition and biological activity. **Methodology:** The search for information was carried out using scientific articles, specialized books and degree theses. **Results and conclusions:** Phenolic compounds of type: acylphenol, lignan, neolignan, flavonoid, alkenylphenol, tocotrienol and phenolic acid were found to produce enzymatic inhibition. Phenolic compounds identified in species of the Myristicaceae family are a promising source of metabolites that produce enzymatic inhibition. Lignan-type metabolites were the ones that presented the greatest number of enzymatic inhibition studies. The information analyzed can serve as a basis for the development of research on the structure-activity relationship and/or molecular coupling between secondary metabolites and inhibited enzymes, with species of the Myristicaceae family.

Keywords: Myristicaceae, enzymatic activity, phenolic compounds.

RESUMO

Metabólitos secundários isolados de espécies da família Myristicaceae que produzem inibição enzimática

Introdução: diferentes espécies da família Myristicaceae têm sido utilizadas para fins medicinais, nutricionais e industriais, mostrando a importância e o potencial da família em vários campos. O uso medicinal tem sido de suma importância para diferentes comunidades indígenas e tem aumentado como alternativa para o tratamento de doenças, razão pela qual a pesquisa está se concentrando na medicina herbal

e plantas medicinales, sendo este o primeiro passo para o desenvolvimento e inovação de produtos farmacêuticos. Entre os tipos de drogas estão os inibidores enzimáticos, que atuam regulando processos metabólicos ou atacando patógenos. **Objetivos:** compilar informações sobre o herbalismo da família Myristicaceae, incluindo aspectos de fitoquímica, etnobotânica, usos industriais, atividade biológica e determinar possíveis metabolitos secundários que produzem inibição enzimática e atividade biológica. **Metodologia:** a busca de informações foi realizada utilizando artigos científicos, livros especializados e teses de graduação. **Resultados e conclusões:** foram encontrados compostos fenólicos como: acylphenol, lignan, neolignan, flavonoid, alkenylphenol, tocotrienol e ácido fenólico para produzir inibição enzimática. Os compostos fenólicos identificados em espécies da família Myristicaceae são uma fonte promissora de metabolitos que produzem inibição enzimática. Os metabolitos do tipo lignano mostraram o maior número de estudos de inibição enzimática. As informações analisadas podem servir como base para o desenvolvimento de pesquisas sobre a relação estrutura-atividade e/ou acoplamento molecular entre metabolitos secundários e enzimas inibidas, com espécies da família Myristicaceae.

Palabra-chaves: Myristicaceae, atividade enzimática, compostos fenólicos.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido ampliamente utilizados en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, sin embargo, aún hay muchos recursos sin explorar en esta área, aproximadamente el 15% de las intervenciones de drogas están relacionadas con las plantas y cerca del 60% de estas fuentes de drogas se concentran solo en diez familias taxonómicas, la mayoría de medicamentos tradicionales a base de plantas, que son utilizados por diferentes comunidades, no han sido explorados para obtener medicamentos [1]. Diversos fármacos que producen inhibición enzimática específica son una de las soluciones más efectivas al tratamiento de enfermedades. De 2006 a 2011 ingresaron en el mercado mundial 149 fármacos biológicos, 51 de ellos fueron inhibidores enzimáticos [2].

Entre los diferentes estudios de la familia Myristicaceae que abarcan las actividades y usos de las especies se destacan los de farmacología (evaluada científicamente y en medicina popular); microbiológicos y de utilidad en las industrias [3], evidenciando el potencial de activos farmacológicos de la familia. Sus árboles son característicos de las selvas húmedas, como la selva del Amazonas, el 80% de las especies de allí pertenecen al género *Virola* e *Iryanthera*, los cuales inspiraron las primeras investigaciones en el área

de la fitoquímica, a causa del uso medicinal que se daba de estas por las comunidades indígenas [4]. A partir de la importancia descrita, el presente artículo de revisión recopila información de la herboristería de la familia Myristicaceae e identifica los posibles metabolitos secundarios que producen inhibición enzimática y actividad biológica.

METODOLOGÍA

Se realizó un análisis cuantitativo de los artículos de la base de datos Scopus relacionados con la familia Myristicaceae para determinar tendencias en torno a esta. Se observó que hay un número significativo de estudios de la familia Myristicaceae en diferentes áreas del conocimiento, sin embargo, el número de reportes de estudios de inhibición enzimática es reducido. Por lo cual surgió la necesidad de realizar una búsqueda bibliográfica que compile información de la herboristería de la familia Myristicaceae, los estudios reportados de la familia Myristicaceae se enfocaron en la inhibición enzimática producida por metabolitos secundarios y que generan alguna actividad biológica.

La búsqueda de bibliografía se hizo con libros especializados, tesis de grado desarrolladas en el grupo de investigación y bases de datos como: Scopus, ScienceDirect, SciELO, *Journal of American Chemical Society* (ACS), SciFinder y Scival.

En las plataformas se utilizó en el motor de búsqueda los comandos: MYRISTICACEAE + INHIBITOR/INHIBITION + ENZYME/ENZYMATIC, también en español MYRISTICACEAE + INHIBIDOR/INHIBICIÓN + ENZIMA/ENZIMÁTICA. La consulta no se restringió a un tiempo determinado, teniendo en cuenta que en el análisis cuantitativo se observaron pocos estudios sobre inhibidores enzimáticos presentes en la familia Myristicaceae. Sin embargo, los resultados de la misma se limitaron a 2017, año donde se procesó y analizó la información.

La información se clasificó de acuerdo con los estudios enzimáticos correspondieran a actividad de inhibición en especies y extractos de la familia Myristicaceae. La depuración de la información se elaboró manualmente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cuantitativo

En la figura 1 se evidencia que en el año 1937 hay un documento reportado; a partir de los años 70 hay una tendencia de aumento, llegando al máximo en 2013 con 37 documentos reportados y para 2017 se reportaron 13 trabajos de investigación.

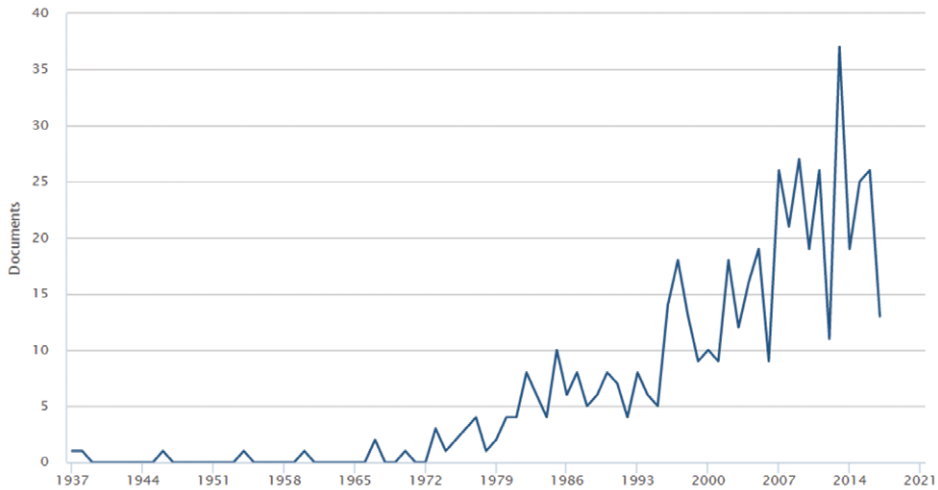


Figura 1. Documentos publicados de la familia Myristicaceae por año. Fuente: <https://www.scopus.com/Scopus> Copyright© 2017.

La figura 2 muestra los reportes de los trabajos realizados sobre inhibición enzimática en la familia Myristicaceae. El primer reporte es de 1988, el segundo de 1996, se evidencia un aumento en 2005 alcanzando el punto máximo en el 2011 con 4 documentos, es destacable que en 2014 y 2017 no se reportaron documentos.

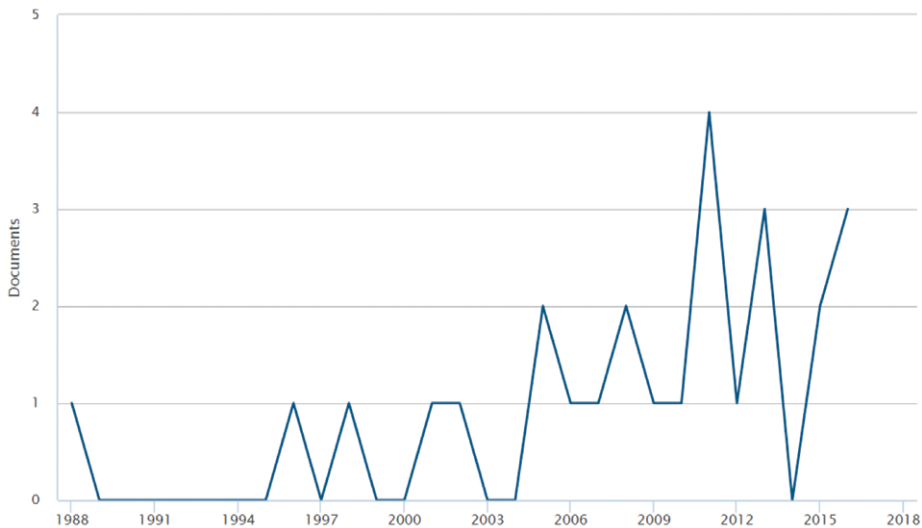


Figura 2. Documentos publicados de estudios de inhibición enzimática en la familia Myristicaceae por año. Fuente: <https://www.scopus.com/Scopus> Copyright© 2017.

Herboristería familia Myristicaceae

La herboristería nace de las tradiciones y prácticas médicas con plantas, que realizaban las sociedades para prevenir y tratar enfermedades y mejorar la calidad de vida [5]. Abarca el estudio de las plantas y las siguientes disciplinas: morfología, taxonomía, etnobotánica, fitoquímica, farmacología, farmacognosia y actividad biológica.

Generalidades

La familia Myristicaceae pertenece al grupo de angiospermas, plantas con flores. Comprende 21 géneros [6], distribuidos en zonas tropicales y característicos de las selvas húmedas de tierras bajas. Comprende árboles de gran porte. La mayoría tienen follaje aromático, con puntos glandulares pequeños y transparentes, al ser cortados sus troncos exudan una resina de color rojo o amarillento. Poseen flores pequeñas de color verde o blanco, carecen de pétalo, unisexuales en plantas dioicas, frutos de carnosos a coriáceos, con una semilla encerrada en un arilo carnoso [7]. Tienen hojas simples, alternas, dísticas o espiraladas, enteras sin estípulas; especies diferenciadas por la diversidad de tricomas (ramificados, lepidotos, estrellados o dendríticos) [8].

Fitoquímica

Se han identificado metabolitos secundarios de especies de Myristicaceae, los más representativos de tipo son: lignanos, neolignanos, flavonoides, terpenos, alcaloides y compuestos aromáticos.

Lignanos

Se forman por acoplamiento de dos unidades de fenilpropano enlazadas por el átomo central de sus cadenas laterales. Se dividen en lignanos simples y ciclolignanos, los primeros presentan una unión C-C a través de las posiciones 8 y 8' de sus cadenas laterales y los ciclolignanos resultan de la formación de otro enlace adicional C-C, creando un nuevo anillo [9].

De la especie *Virola sebifera* se identificaron: diacetato de rac-(8 α ,8' β)-4, 4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxilignan-9,9'-diil 1, diacetato de rac-(8 α ,8' β)-4-hidroxi-3-metoxi-3', 4'-metilenodioxilignan-9,9'-diil 2, (8R,8'R)-4'-hidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olida (haplomyrfolina) 3 [10]. Y los lignanos furofuranicos (+)-sesamina 4, (+)-kobusina 5, (+)-eudesmina 6 [11, 12]. Del extracto etanólico de *Virola calophylla* se elucidó otobaeno 7 e hidroxiotobaeno 8 [3]; el compuesto último se identificó en la especie *Osteophloeum sulcatum*, de la cual también se aislaron los lignanos: otobafenol 9, ácido (-) dihidroguayarético 10, verrucosina 11, rel (7S, 8S, 8'R)-7-hidroxi-3,4-3',4'-dimetilenodioxil- 8,8'-lignano (saururinol) 12 [13]. De las especies *Virola calophylla*

y *calophylloidea* se identificaron los lignanos: calofina 13, calofilina 14, ácido meso-dihidroguayarático 15, y austrobailignano 16 [14].

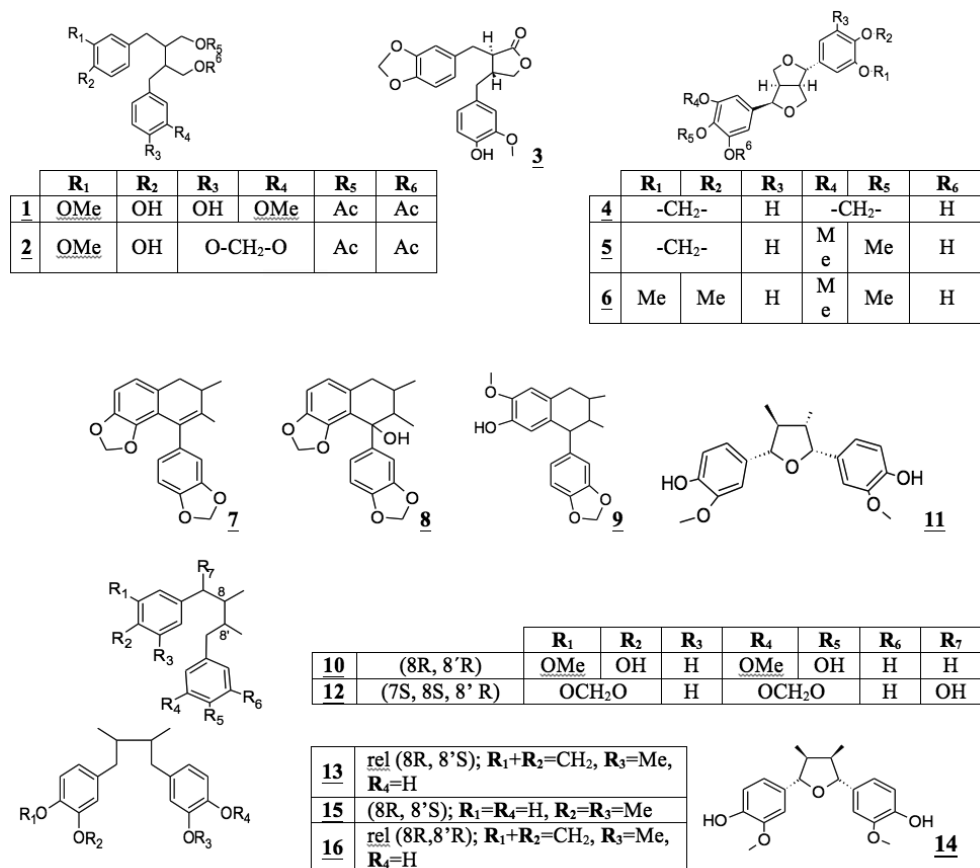


Figura 3. Lignanos reportados de las especies de la familia Myristicaceae.

Neolignanos

Metabolitos secundarios que comprenden unidades C6-C3 unidos por posiciones diferentes a las 8-8' [9]. De la especie *Iryanthera ulei* se aislaron los neolignanos de tipo 8-O-4-: irianteral **17** y machilina C **18** [15]. De la especie *Virola pavonis* se identificaron los compuestos 8,4'-oxyneolignano **19**, cusiderina E **20** y 4',7-epoxi-8,3'-neolignano, fragransol A **21** [16].

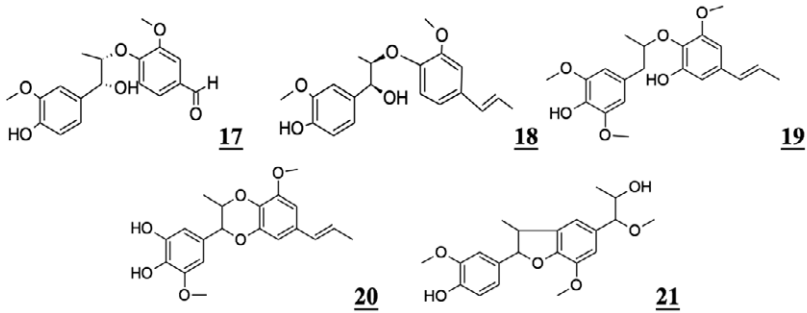


Figura 4. Neolignanos reportados de las especies de la familia Myristicaceae.

Flavonoides

Metabolitos secundarios formados por dos núcleos fenólicos conectados por tres unidades de carbono C6-C3-C6. En las especies de la familia Myristicaceae se han encontrado flavonoides de tipo: chalconas, flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, flavanas, flavan-3-ols, 1,3- diarilpropanos (virolanos), 1,3-diaril-2-propanoles (virolanoles), dihidrochalconas, isoflavonas y pterocarpanos [17].

Dos chalconas se han sido aisladas de la especie *Iryanthera polyneura*, diferenciadas por el grupo metil e hidroxil en el C4, 4,2',4'- trihidroxi-3-metoxidihidrochalcona **22**, 2',4'-dihidroxi- 3,4-dimetoxidihidrochalcona **23**. La flavanona pinocembrina, 1-(2',4'-dihidroxifenil)-3-(3'',4''-metilendioxfenil)-propano **24** fue aislada de hojas y raíces de *Iryanthera polyneura* [18] y 7,4'-dimetoxiflavanona **25** se identificó en la especie *Virola carinata* [19].

Flavonas se aislaron de la especie de *Virola venosa*: 7,4'-dimetoxiflavona **26**, 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona **27**, 7,3',4'-trimetoxiflavona **28**, 7-metoxi-3',4'-metilendioxflavona **29** [20].

En la especie *Iryanthera sagotiana*, se identificaron dihidroflavonoles de tipo 3-O- α -L-ramnosildihidroflavonoles, engeletina **30**, astilbina **31**, isoengeletina **32**, isoastilbina **33** y flavonoles 3-O- α -L-ramnosilflavonoles, afzelina **34**, quercitrina **35** [21].

Flavanas han sido identificadas de las especies *Knema autrosiamensis* 7-4'-dihidroxi-3'-metoxiflavana **36** de *Virola calophylloidea* [22], (\pm)-4'-hidroxi-3',7'-dimetoxiflavana **37** [23], de *Iryanthera coriacea* (\pm)-3',4'-dihidroxi-5,7-dimetoxiflavana **38** [24], de *Iryanthera grandis* **36** y (\pm)-5,7-dimetoxi-4'-hidroxiflavana **39** [25], de *Iryanthera juruensis* 2'-hidroxi-7-metoxi-4',5' metilendioxflavana **40** [24], de *Iryanthera laevis* 7,2'-dihidroxi-6,8-dimetil-4',5'-metilendioxflavana **41**, 7,2'-dihidroxi-5,8-dimetil-4',5'-metilendioxflavana **42**, 5,2'-dihidroxi-7-metoxi-6,8-dimetil-4',5'-metilendioxflavana **43** [26].

Flavan-3-oles se han aislado de *Virola elongata* (-) fisetinidol **44** [27] y (-) epicatequina **45** de las semillas de *Myristica fragrans* [28].

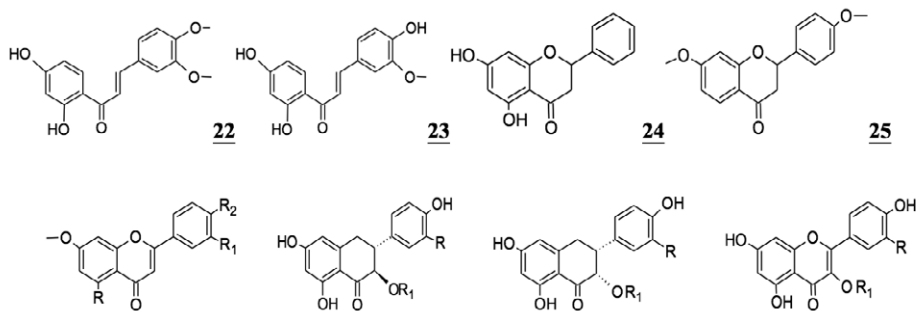
Los compuestos de tipo 1-3-diarilpropanos y 1,3 diaril-2-propanoles fueron encontrados principalmente en el género *Virola* por lo cual se conocen como virolanos y virolanoles respectivamente [29]. 15 virolanos **46-60** y 3 virolanoles **61, 62, 63** [27].

Las dihidrochalconas **64-67** han sido reportadas en *Iryanthera sagotiana* [21], **68** en *I. polyneura* [18], en *I. laevis* **69, 70** [30]. En el género *Virola*, se identificó (\pm)- α -hidroxidihidrochalcona **71** en las especies *V. calophylloidea* [24] y *V. surinamensis* [31]. El primer biflavonoide 3',3''-bis-2',4',6'-Trihidroxi-4-metoxidihidrochalcona **72**, de la familia Myristicaceae se aisló de las hojas de *Iryanthera sagotiana* [21].

En este grupo se destacan, unos tipos de compuestos complejos de hidrochalconas, conocido como Iryanterinas identificadas exclusivamente en especies del género *Iryanthera*, diferenciadas por una letra de la A a la J. De la especie *I. laevis* se identificaron **73-A, 74-B, 75-C, 76-D, 77-E** [30], [32] de *I. paraensis* **78-F** [33] en *I. grandis* se identificaron **79-G, 80-H, 81-I, 82-J** [34].

Los flavonoides de tipo isoflavonas son también característicos de la familia Myristicaceae, se han identificado en diferentes especies del género *Virola*, *Knema*, *Otoba*, *Pycnanthus* [17]. De la especie *V. caducifolia* se aislaron: 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona (biochanina) **83**, 5, 7,2'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona **84**, 5,7-dihidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavona **85** [35]; en la especie *V. surinamensis* se elucido **83**, 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona **86**, 2'-hidroxi-7,4-dimetoxiisoflavona **89** [31]; en *V. carinata* 7,2'-dihidroxi-4'metoxi isoflavona **87**, 5,7,4'-trihidroxi isoflavona **88**, 5,4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona **90** [36]; de la especie *V. surinamensis* se identificó 5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxi isoflavona **91** [37]; en *Knema glomerata* se aisló el compuesto **92** [38].

De las hojas de *Osteophloeum platyspermum* se aislaron dos pterocarpanos, (\pm)-3-dimetilhomopterocarpina conocida también como medicarpina **93** y (\pm)-maackiaina **94** [39].

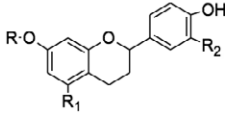


	R	R ₁	R ₂
<u>26</u>	H	H	OMe
<u>27</u>	H	OH	OMe
<u>28</u>	H	OMe	OMe
<u>29</u>	H	-OCH ₂ O	

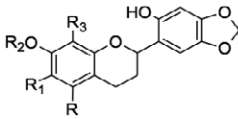
	R	R ₁
<u>30</u>	H	Rha
<u>31</u>	OH	Rha

	R	R ₁
<u>32</u>	H	Rha
<u>33</u>	OH	Rha

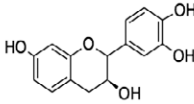
	R	R ₁
<u>34</u>	H	Rha
<u>35</u>	OH	Rha



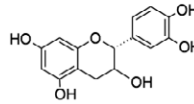
	R	R ₁	R ₂
<u>36</u>	H	H	OMe
<u>37</u>	Me	H	OMe
<u>38</u>	Me	OMe	OH
<u>39</u>	Me	OMe	H



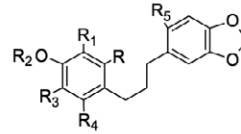
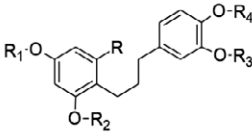
	R	R ₁	R ₂	R ₃
<u>40</u>	H	H	Me	H
<u>41</u>	H	Me	H	Me
<u>42</u>	Me	H	H	Me
<u>43</u>	OH	Me	Me	Me



44

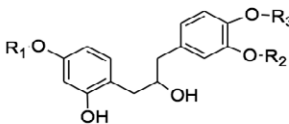


45

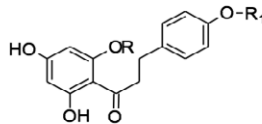


	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>46</u>	H	H	Me	H	Me
<u>47</u>	H	H	Me	Me	H
<u>48</u>	H	Me	H	Me	H
<u>49</u>	H	Me	H	H	Me
<u>50</u>	OMe	Me	H	Me	H

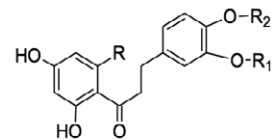
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>51</u>	H	H	H	H	OH	H
<u>52</u>	H	H	Me	H	OH	H
<u>53</u>	H	H	H	H	OH	OMe
<u>54</u>	H	H	Me	H	H	OH
<u>55</u>	H	H	H	Me	OH	OMe
<u>56</u>	H	Me	Me	H	OH	OH
<u>57</u>	H	Me	H	H	OMe	OH
<u>58</u>	H	Me	H	Me	OH	OH
<u>59</u>	OMe	Me	H	Me	OH	OH
<u>60</u>	OMe	H	Me	H	OH	H



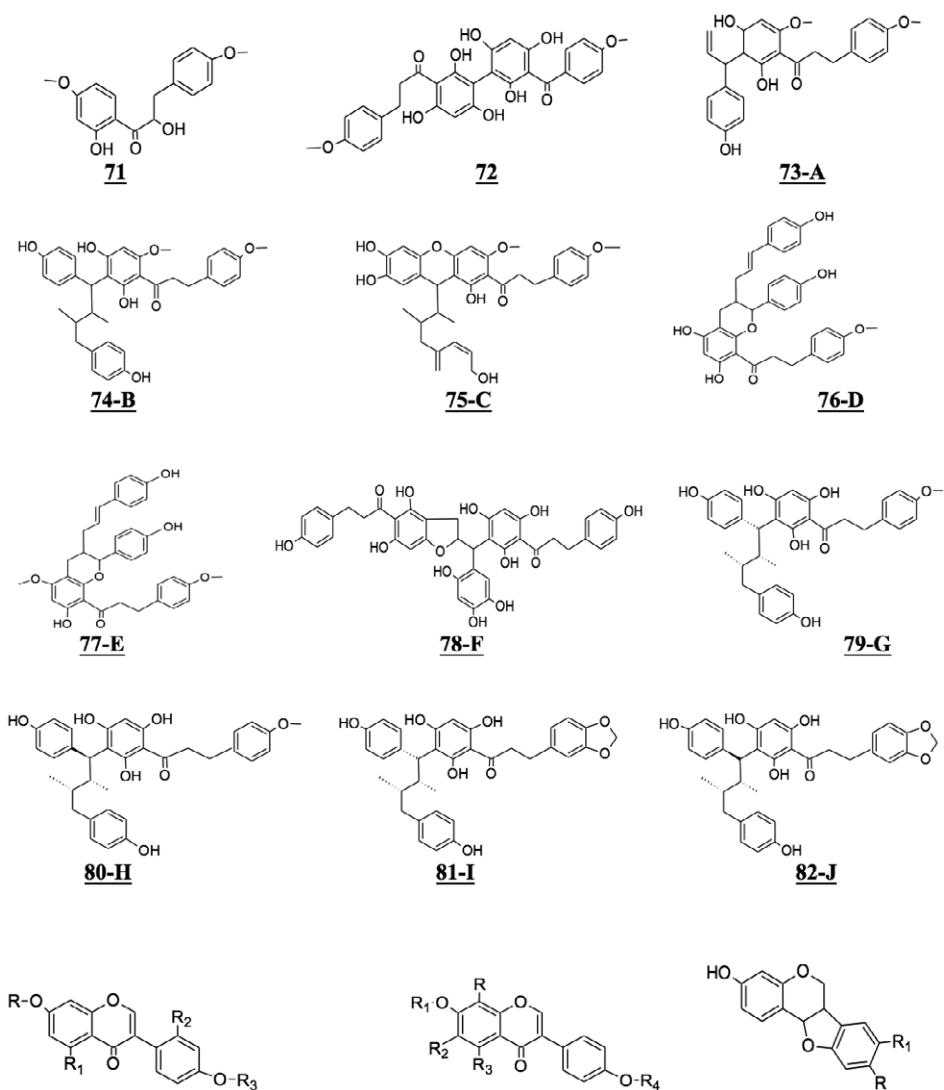
	R ₁	R ₂	R ₃
<u>61</u>	H	-CH ₂ -	
<u>62</u>	H	Me	H
<u>63</u>	Me	Me	H



	R	R ₁
<u>64</u>	H	Me
<u>65</u>	Me	H
<u>66</u>	Me	Me
<u>67</u>	Glu	Me



	R	R ₁	R ₂
<u>68</u>	H	Me	H
<u>69</u>	OMe	Me	Me
<u>70</u>	OMe	-OCH ₂ O-	



	R	R ₁	R ₂	R ₃
83	H	OH	H	Me
84	H	OH	OH	Me
85	H	OH	OMe	Me
86	H	H	H	Me
87	H	H	OH	Me
88	H	OH	H	H
89	Me	H	OH	Me

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
90	H	Me	H	OH	H
91	H	H	OMe	OH	Me
92	OMe	H	H	H	Me

	R	R ₁
93	OMe	H
94	-OCH ₂ O-	

Figura 5. Flavonoides reportados de las especies de la familia Myristicaceae.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales están constituidos por una variedad de compuestos químicos volátiles, principalmente terpenos, así como compuestos aromáticos y alifáticos. En el aceite esencial de los frutos de *Iryanthera ulei* se determinaron compuestos de tipo sesquiterpeno, se destacaron: α -muurolol **95**, espatulenol **96** α -cadinol **97**, guaiol **98**, oplopanone **99**, 1,10-diepicubanol **100** y limoneno **101** [40]. De las hojas de *Osteophloeum platyspermum* se identificaron cincuenta terpenos de los cuales 44% correspondieron a monoterpenos y 56% a sesquiterpenos, los principales compuestos aislados de este estudio fueron **101**, β -pineno **102** y α -pineno **103** [41]. De la especie *Virola calophylla* se determinaron los compuestos Vainillina **104**, Safrol **105** y Metilparabeno **106** [3].

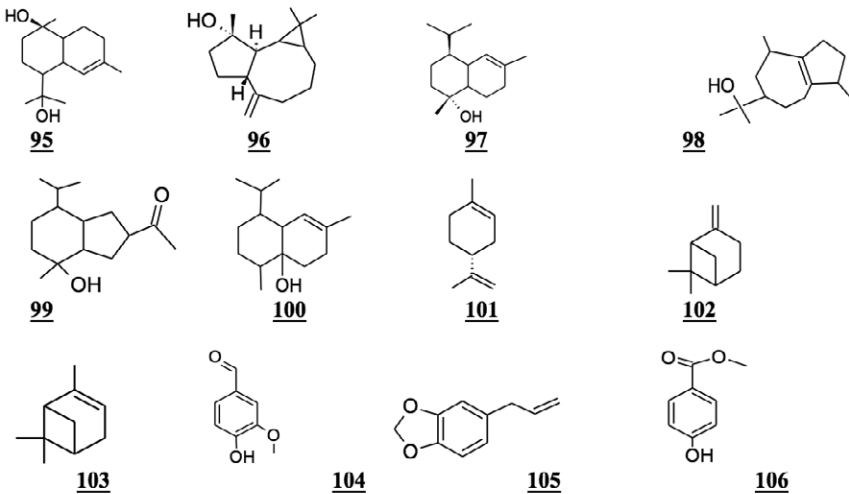


Figura 6. Aceites esenciales reportados de las especies de la familia Myristicaceae.

Alcaloides

De la especie *Virola theidora*, se identificaron los alcaloides: 2-metil-tetrahydroarmina **107**, N-metilriptamina **108**, N,N-Dimetilriptamina **109**, 5-metoxi-N-metilriptamina **110**, 5-metoxi-N,N-dimetilriptamina **111**, 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina **112**, 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina **113**; en *Virola calophylla* **108**, **109**, **111**; en *Virola rufula* **108**, **109**, **110**, **113**; en *Virola multinervia* y *Virola venosa* **109**, **111** [42].

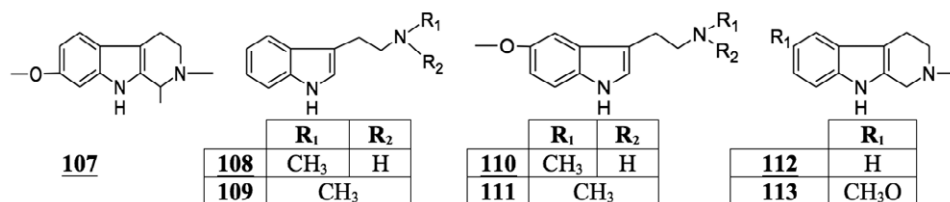


Figura 7. Alcaloides reportados de las especies de la familia Myristicaceae.

Etnobotánica

Especies de la familia Myristicaceae son utilizadas en medicina popular, generalmente, en forma de infusiones, decocciones y cataplasmas, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, infecciones y enfermedades de la piel entre otros usos. En la tabla 1 se presenta información etnobotánica de algunas especies de la familia Myristicaceae.

Tabla 1. Información etnobotánica de algunas especies de la familia Myristicaceae.

Especie	Usos	Órgano	Ref.
<i>Horsfieldia irya</i>	Infecciones intestinales.	Hojas, corteza	[43]
	Llagas y granos.	Corteza	
<i>Viola calophylla</i>	Los indígenas de la Amazonía colombiana usan preparados en forma de rapé, conocido como yakeé, para producir efectos alucinógenos o como narcótico.	Corteza	[3] [14]
<i>Viola michelli</i>	Enfermedades de la piel.	Hojas	[44]
<i>Viola oleifera</i>	Utilizada para aliviar los trastornos gástricos-intestinales, como antiinflamatorio, cicatrizante, para estimular la memoria y la inteligencia cerebral.	Hojas	[45]
<i>Viola surinamensis</i>	Úlcera, gastritis, inflamación estomacal y cáncer.	Corteza	[46]
<i>Pycnanthus angolensis</i>	Úlcera, hemorroides, potenciador de la memoria y anti-envejecimiento	Hojas	[47]
	Ictericia, tuberculosis.	Tallo	
	Utilizada para el tratamiento de la malaria y las fiebres.	Corteza, hojas	[48]
	Dolor de muelas, dolor de cabeza, dolor de garganta, úlceras y heridas.	Corteza	[49]
<i>Iryanthera laevis</i>	Se conoce en el Caquetá como “Otoba” o “Kimo” y en San Martín (Meta) como “Mamita”, donde comen el arilo del fruto en forma de un preparado azucarado.	Fruto	[30]
<i>Iryanthera ulei</i>	Se utiliza tradicionalmente para tratar diarrea, infecciones orales, malaria y anemia.	Fruto	[40]

(Continúa)

Especie	Usos	Órgano	Ref.
<i>Myristica dactyloides</i>	Se utiliza como un gargarismo para las enfermedades bucales y varias partes del árbol se utilizan como medicina en el tratamiento del ganado.	Corteza, tallo, hojas	[50]
<i>Myristica fragrans</i>	Escalofríos, fiebre, reumatismo, bronquitis, dolor torácico.	Semillas, nuez	[51]

Actividad biológica

La tabla 2 muestra información respecto a algunos estudios reportados de diferentes actividades biológicas de algunas de las especies de la familia Myristicaceae.

Tabla 2. Información sobre actividad biológica de algunas especies de Myristicaceae.

Actividad	Especie	Órgano	Ref.
Antimicrobiana	<i>Iryanthera ulei</i>	Fruto	[40]
	<i>Virola calophylla</i>	Hojas	[3]
Antifúngica	<i>Virola oleifera</i>	Arilos	[52]
	<i>Virola surinamensis</i>	Raíces	[31]
Antioxidante	<i>Myristica malabarica</i>	Fruto	[53]
	<i>Myristica máxima</i>	Corteza	[54]
Antiinflamatoria	<i>Virola michelli</i>	Hojas	[44]
Antileishmanial	<i>Virola pavanis</i>	Hojas	[55]
	<i>Virola surinamensis</i>	Hojas	
Antiulcerogénica	<i>Virola surinamensis</i>	Resina	[46]
Actividades antinociceptivas y antiulcerosas	<i>Pycnantus angolensis</i>	Corteza del tallo	[49]
Antiplasmodial Antimalaria	<i>Pycnantus angolensis</i>	Corteza del tallo	[48]

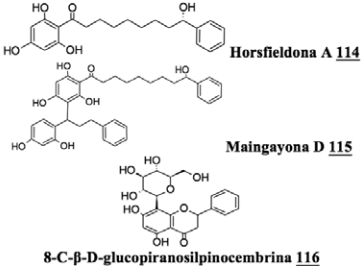
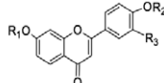
Usos industriales

El uso primario de las Miristicáceas es maderable. Las especies llamadas cuángares o castaños son explotadas para madera de aserrío, extracción de pulpa de papel, en industrias locales para la elaboración de palos y cajas. Como fuente de alimento para comunidades rurales o para comunidades indígenas. El árbol de *Myristica fragrans* se cultiva principalmente por su semilla, conocida como “nuez moscada”, la cual es utilizada como condimento. La pulpa del fruto es usada en la elaboración de jugos, jaleas, etc. [56]. Con la especie *Virola sebifera* se fabrican jabones de tocador y manteca para el cabello por su alto contenido de grasas como los compuestos trimiristina y laurodimiristina [10].

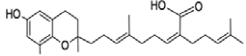
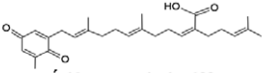
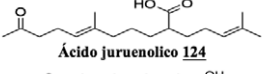
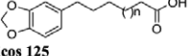
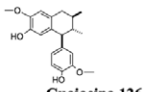
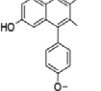
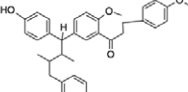
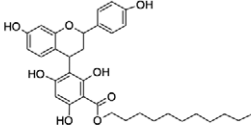
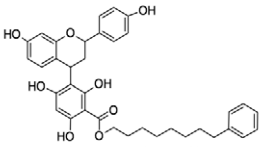
Estudios reportados de inhibición enzimática de especies de la familia Myristicaceae

Se obtuvo un total de 33 estudios reportados y dos patentes sobre inhibición enzimática de especies de la familia Myristicaceae. En la tabla 3 se muestra los reportes encontrados por especie, indicando la enzima potencialmente inhibida, estudios de actividad biológica, el país donde se desarrolló, el órgano que fue estudiado, compuestos aislados o extractos evaluados, las referencias bibliográficas. Posteriormente, en la tabla 4 se muestra las descripciones de las patentes encontradas.

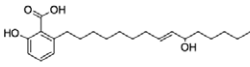
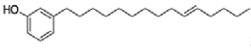
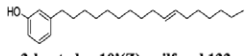
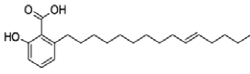
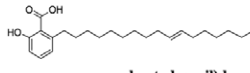
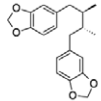
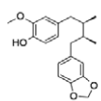
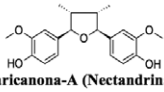
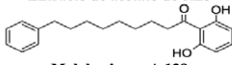
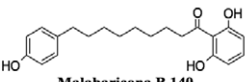
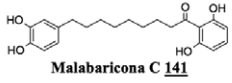
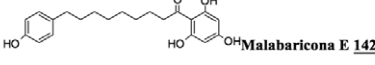
Tabla 3. Estudios reportados de inhibición enzimática de metabolitos o extractos de especies de la familia Myristicaceae.

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos																								
<i>Horsfieldia macrobotrys</i>	α -glucosidasa [57]	Antioxidante, antidiabética	Tailandia	Corteza	 <p>Horsfieldona A 114 Maingayona D 115 8-C-β-D-glucopiranosilpinocembrina 116</p>																								
<i>H. superba</i>	Acetilcolinesterasa [58]	—	Malasia	Corteza	Extracto de cloroformo, extracto de acetato de etilo																								
<i>Iryanthera juruensis</i>	Ciclooxigenasas (COX-1 -2) [59]	Antioxidante	Brasil	Hojas, semillas	<p>Extracto metanólico de hojas, extracto hexano de semillas</p>  <table border="1" data-bbox="686 1319 1039 1528"> <thead> <tr> <th>Deoxiflavonas</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7,4'-dimetoxiflavona 117</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Fasciculiferina 118</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>OCH₃</td> </tr> <tr> <td>Titonina 119</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Farnisina 120</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>7,4'-dihidroxi-flavona 121</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>	Deoxiflavonas	R ₁	R ₂	R ₃	7,4'-dimetoxiflavona 117	CH ₃	CH ₃	H	Fasciculiferina 118	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	Titonina 119	CH ₃	CH ₃	OH	Farnisina 120	H	CH ₃	OH	7,4'-dihidroxi-flavona 121	H	H	H
Deoxiflavonas	R ₁	R ₂	R ₃																										
7,4'-dimetoxiflavona 117	CH ₃	CH ₃	H																										
Fasciculiferina 118	CH ₃	CH ₃	OCH ₃																										
Titonina 119	CH ₃	CH ₃	OH																										
Farnisina 120	H	CH ₃	OH																										
7,4'-dihidroxi-flavona 121	H	H	H																										

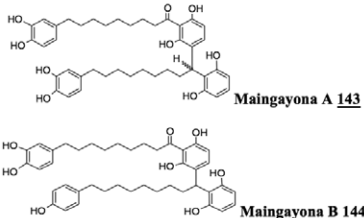
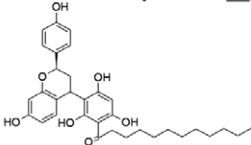
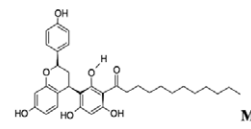
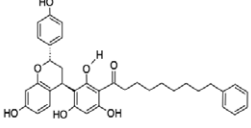
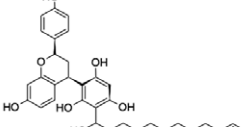
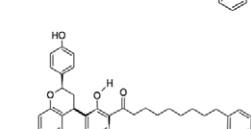
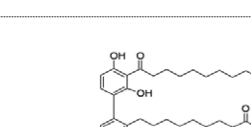
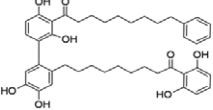
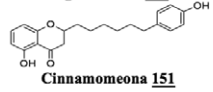
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos						
<i>Iryanthera juruensis</i>	Ciclooxigenasas (COX-1-2) [59]	Antioxidante	Brasil	Hojas, semillas	 <p>Sargacromenol 122</p>  <p>Ácido sargaquinoico 123</p>  <p>Ácido juruenolico 124</p>  <p>Ácidos ω- arilalkanoicos 125</p>  <p>Guaiacina 126</p> <table border="1" data-bbox="1052 606 1131 718"> <tr> <td>A</td> <td>n = 12</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>n = 14</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>n = 16</td> </tr> </table>	A	n = 12	B	n = 14	C	n = 16
A	n = 12										
B	n = 14										
C	n = 16										
<i>Iryanthera megistophylla</i>	Acetilcolinesterasa [60]	Antibacterial antifúngica antiviral	Canadá	Corteza	 <p>Megisignano (2,3-dimetil-4-(4-metoxifenil)-6-hidroxi-naftaleno) 127</p>  <p>Iryanterina K 128</p>						
<i>Knema elegans</i>	ADN Polimerasa β [61]	_____	Estados Unidos	Corteza	 <p>(+)-Myristinina A 129</p>  <p>(+)-Myristinina D 130</p>						

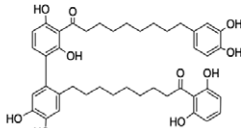
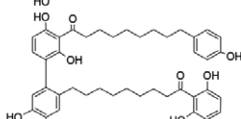
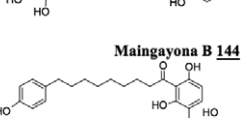
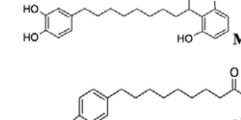
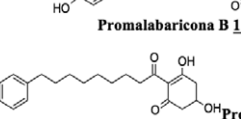
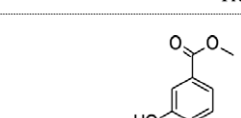
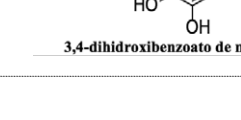
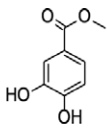
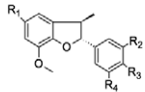
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>Knema laurina</i>	Acetilcolinesterasa [62]	_____	Malasia	Corteza	 <p>(+) Ácido -2-hidroxi-6-(10'-hidroxipentadec-8'(E)-enil) benzoico 131</p>  <p>3-pentadec-10'(Z)-enilfenol 132</p>  <p>3-heptadec-10'(Z)-enilfenol 133</p>  <p>Ácido 2-hidroxi-6-(pentadec-10'(Z)-enil) benzoico 134</p>  <p>Ácido 2-hidroxi-6-(10'(Z)-heptadecenil) benzoico 135</p>
<i>Myristica argentea</i>	Anti-17β-hidroxisteroide dehidrogenasa anti-aromatasa [63]	Antioxidante anti proliferativa	Francia	Semilla	 <p>Treo-austrobaillignano-5 136</p>  <p>Eritro-austrobaillignano-6 137</p> <p>Ácido meso-dihidroguairetico 15</p>  <p>Malabaricana-A (Nectandrina B) 138</p>
<i>Myristica cinnamomea</i>	Acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa [64]	_____	Malasia	Frutos	<p>Extracto de acetato de etilo</p>  <p>Malabaricana A 139</p>  <p>Malabaricana B 140</p>  <p>Malabaricana C 141</p>  <p>Malabaricana E 142</p>

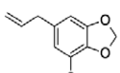
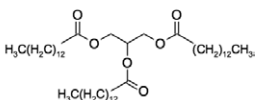
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>Myristica cinnamomea</i>	Acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa [64]	_____	Malasia	Frutos	 <p>Maingayona A <u>143</u></p> <p>Maingayona B <u>144</u></p>
<i>Myristica cinnamomea</i>	Ciclooxigenasa-2 [65]	Antifúngica	Tailandia	Frutos	<p>Myristinina A <u>129</u></p>  <p>Myristinina B <u>145</u></p>  <p>Myristinina C <u>146</u></p>  <p>Myristinina D <u>147</u></p>  <p>Myristinina E <u>148</u></p>  <p>Myristinina F <u>149</u></p> 
<i>Myristica cinnamomea</i>	α -glucosidasa [66]	_____	Malasia	Corteza	<p>Giganteona D <u>150</u></p>  <p>Cinnamomeona <u>151</u></p> 

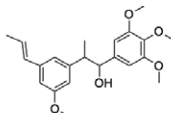
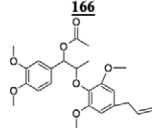
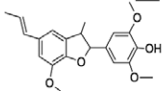
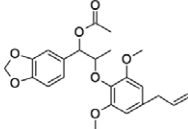
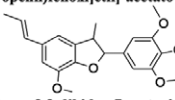
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos																																			
<i>Myristica crassa</i>	Acetilcolinesterasa [67]	_____	Francia	Hojas, Frutos	<p>Malabaricon A <u>139</u> Malabaricon B <u>140</u> Malabaricon C <u>141</u></p>  <p>Giganteona A <u>152</u></p>  <p>Giganteona C <u>153</u></p>  <p>Maingayona B <u>144</u></p>  <p>Maingayona C <u>154</u></p>  <p>Promalabaricon B <u>155</u></p>  <p>Promalabaricon C <u>156</u></p> 																																			
<i>Myristica fatua</i>	α -glucosidasa [68]	Antioxidante	Indonesia	Corteza	 <p>3,4-dihidroxi benzoato de metilo <u>157</u></p>																																			
<i>Myristica fragrans</i>	Óxido nítrico inducible sintasa [69]	_____	China	Semillas	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> <th>R4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Licarina B <u>158</u></td> <td>CH=CH-CH₃</td> <td>OCH₂O</td> <td></td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3'-metoxilicarina B <u>159</u></td> <td>CH=CH-CH₃</td> <td>OCH₂O</td> <td>OCH₃</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mirisfrageal A <u>160</u></td> <td>CHO</td> <td>OCH₂O</td> <td></td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Isodihidrocinatidin a <u>161</u></td> <td>CH₂CH=CH₂</td> <td>OCH₃</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Dehidrodilisoegenol <u>162</u></td> <td>CH=CH-CH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Mirisfrageal B <u>163</u></td> <td>CHO</td> <td>OCH₂O</td> <td></td> <td>OCH₃</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	R3	R4	Licarina B <u>158</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₂ O		H	3'-metoxilicarina B <u>159</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₂ O	OCH ₃		Mirisfrageal A <u>160</u>	CHO	OCH ₂ O		H	Isodihidrocinatidin a <u>161</u>	CH ₂ CH=CH ₂	OCH ₃	OH	H	Dehidrodilisoegenol <u>162</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₃	OH	H	Mirisfrageal B <u>163</u>	CHO	OCH ₂ O		OCH ₃
	R1	R2	R3	R4																																				
Licarina B <u>158</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₂ O		H																																				
3'-metoxilicarina B <u>159</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₂ O	OCH ₃																																					
Mirisfrageal A <u>160</u>	CHO	OCH ₂ O		H																																				
Isodihidrocinatidin a <u>161</u>	CH ₂ CH=CH ₂	OCH ₃	OH	H																																				
Dehidrodilisoegenol <u>162</u>	CH=CH-CH ₃	OCH ₃	OH	H																																				
Mirisfrageal B <u>163</u>	CHO	OCH ₂ O		OCH ₃																																				

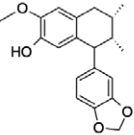
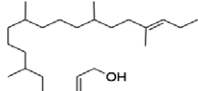
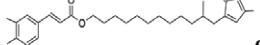
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>Myristica fragrans</i>	Ácido graso amida hidrolasa, monoacilglicerol lipasa [70]	_____	Estados Unidos	Semillas	Extracto de diclorometano Extracto de acetato de etilo
	Aminopirina N-demetilasa, hexobarbital hidroxilasa [71]	_____	Corea	Semillas	 <p>Myristicina 164 Licarina-B 158 Dehidroliisoeugenol 162</p>
	Acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina [72]	_____	India	_____	<p>Myristicina 164</p>  <p>Trimiristina 165</p>
	Ácido graso sintasa [73]	_____	China	Semillas	Extracto etanólico
	Óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2) [74]	Antiinflamatoria	Corea	Semillas	Malabaricona C 141

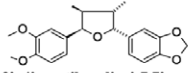
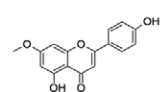
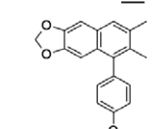
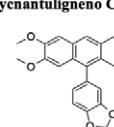
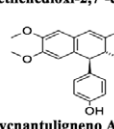
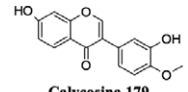
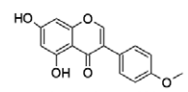
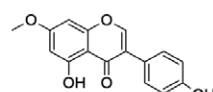
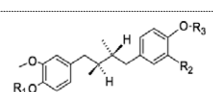
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>Myristica fragrans</i>	Elastasa [75]	Antiinflamatoria	Corea del Sur	Semillas	Extracto metanólico
	Sulfotransferasa (SULT) [76]	—	Países Bajos	Ariolo del fruto	Extracto metanólico
	PARP-1 Poli (adenosina 50-difosfato (ADP)-ribosa) polimerasa 1 [77]	—	Estados Unidos	Ariolo del fruto	 <p>(S) 1-(3,4,5-trimethoxyfenil)-2-(3-metoxi-5-(prop-1-il) fenil)-propan-1-ol 166</p>  <p>benzenemethanol; a-[1-[2,6-dimetoxi-4-(2-propen-1-il)fenoxi]etil]-3,4-dimetoxi-1-acetato 167</p>  <p>Odoratisol A, (fenol, 4-[(2S,3S)-2,3-dihidro-7-metoxi-3-metil-5-(1E)-1-propenil-2-benzofuranil]-2,6-dimetoxi) 168</p>  <p>1,3-benzodioxato-5-metanol, a-[1-[2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)fenoxi]etil]-acetato 169</p>  <p>Licarina C; (benzofuran, 2,3-dihidro-7-metoxi-3-metil-5-(1E)-1-yl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)) 170</p>
	Óxido nítrico sintasa [78]	—	Corea	Semilla	Nectandrina B 138

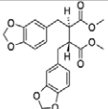
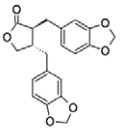
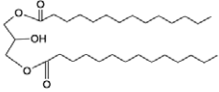

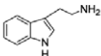
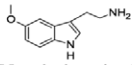
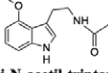

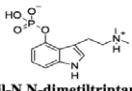
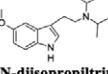
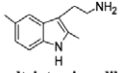
(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>Myristica fragrans</i>	Fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina [79]	_____	India	Semillas	Extracto etanólico
	Tirosina fosfatasa 1B [80]	_____	Corea	Semilla	Ácido meso-dihidroguaiaretico <u>15</u> Otobafenol <u>9</u>
	Uroquinasa [81]	_____	Indonesia	Semillas	 Macelignano (8R,8S)-7-(3,4-metilenedioxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-8,8-dimetilbutano <u>171</u>
<i>M. malabarica</i>	Ciclooxigenasas (COX 1-2) [82]	Antiulcerogénica	India	Corteza de fruta seca	Malabaricona B <u>140</u> Malabaricona C <u>141</u>
	Profil endopeptidasa [83]	_____	Japón	Tronco	Extracto metanólico
<i>P. angolensis</i>	Acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa [47]	_____	Nigeria	Hojas	Extracto metanólico Extracto de hexano Extracto de acetato de etilo  Eluptol (2E, 18E) -3,7,11,15,18-pentametilhénicoso-2,18-dien-1-ol <u>172</u>  Omifoato A [12-(4-hidroxi-3-metil-oxo-ciclopenta-1,3-dien-1il) -11-metil-dodecil] (E)-3-(3,4-dimetilfenil) prop-2-enoato <u>173</u>

(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos																							
<i>P. angolensis</i>	H ⁺ -ATPasa [84]	Antimicrobiana antifúngica, antimicrobacterial	Camerún	Raíces	<p>Extracto CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1)</p>  <p>3,4-dimetoxi-3',4'-metilenedioxi-7,7'-epoxilignano 174</p>  <p>Genkwainina 175</p>  <p>Pycnantuligneno C 176</p>  <p>4,5-dimetoxi-3',4'-metilenedioxi-2,7'-cicloligna-7,7'-dieno 177</p>  <p>Pycnantuligneno A 178</p>																							
				Frutos	 <p>Calycosina 179</p>  <p>Biochanina A 180</p>  <p>Prunetina 181</p>																							
	Lactato deshidrogenasa [85]	Inducción de apoptosis	Portugal	Corteza	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>treo-4,4'-dihidroxi-3-metoxilignano 182</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>4'-hidroxi-3,3',4'-trimetoxilignano 183</td> <td>CH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Ácido (-)-dihidroguairetico 10</td> <td>H</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3,3',4,4'-tetrametoxilignano 184</td> <td>CH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>4,4'-diacetil-3,3'-dimetoxilignano 185</td> <td>Ac</td> <td>OCH₃</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	treo-4,4'-dihidroxi-3-metoxilignano 182	H	H	H	4'-hidroxi-3,3',4'-trimetoxilignano 183	CH ₃	OCH ₃	H	Ácido (-)-dihidroguairetico 10	H	OCH ₃	H	3,3',4,4'-tetrametoxilignano 184	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	4,4'-diacetil-3,3'-dimetoxilignano 185	Ac	OCH ₃
	R ₁	R ₂	R ₃																									
treo-4,4'-dihidroxi-3-metoxilignano 182	H	H	H																									
4'-hidroxi-3,3',4'-trimetoxilignano 183	CH ₃	OCH ₃	H																									
Ácido (-)-dihidroguairetico 10	H	OCH ₃	H																									
3,3',4,4'-tetrametoxilignano 184	CH ₃	OCH ₃	CH ₃																									
4,4'-diacetil-3,3'-dimetoxilignano 185	Ac	OCH ₃	Ac																									

(Continúa)

SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos
<i>P. angolensis</i>	Lactato deshidrogenasa [85]	Inducción de apoptosis	Portugal	Corteza	 <p>Heliobuphthalmina 186</p>  <p>Hinokinina 187</p>
<i>P. angolensis</i>	α -glucosidasa [86]	Antioxidante	Camerún	Fruto	 <p>Gliceril-1,3-ditetradecanoato 188</p> <p>Ácido sargaquinoico 122 Sargacromenol 123</p>
<i>Virola sebifera, Virola elongata, Virola calophylla</i>	Monoamina oxidasa [87]	_____	Canadá	Corteza, hojas	 <p>5-hidroxi-triptofano 189</p>  <p>Triptamina 190</p>  <p>5-Metoxi-triptamina 191</p>  <p>5-metoxi-N-acetil-triptamina 192</p> <p>N-metil-triptamina 108 N,N-dimetiltriptamina 109 5-Metoxi-N,N-dimetiltriptamina 111</p>  <p>4-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina 193</p>  <p>4-fosforil-N,N-dimetiltriptamina 194</p>  <p>5-Metoxi-N,N-diisopropiltriptamina 195</p>  <p>2,5-dimetil-pirroltriptamina otil-etilindol 196</p>

(Continúa)

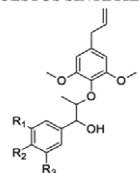
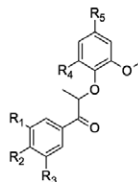
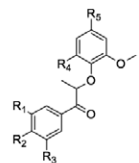
SP.	Enzima	Actividad	País	Órgano	Compuestos/extractos																																																																																																																							
<i>Myristica fragrans, Virola surinamensis</i>	(1,3)- β -glucano sintasa [88]	Antifúngica	Argentina		<p>COMPUESTOS SINTETIZADOS</p>  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>Conf.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>197</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>198</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>treo</td> </tr> <tr> <td>199</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>treo</td> </tr> <tr> <td>201</td> <td>-O-CH₂-O-</td> <td></td> <td>H</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>202</td> <td>-O-CH₂-O-</td> <td></td> <td>H</td> <td>treo</td> </tr> </tbody> </table>  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₄</th> <th>Conf</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>203</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>alil</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>204</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>alil</td> <td>treo</td> </tr> <tr> <td>205</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>trans-propenil</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>206</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>trans-propenil</td> <td>treo</td> </tr> <tr> <td>207</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>trans-propenil</td> <td>eritro</td> </tr> <tr> <td>208</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>trans-propenil</td> <td>treo</td> </tr> </tbody> </table>  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₄</th> <th>R₅</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>209</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>OCH₃</td> <td>alil</td> </tr> <tr> <td>210</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>alil</td> </tr> <tr> <td>211</td> <td>-O-CH₂-O-</td> <td></td> <td>H</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> </tr> <tr> <td>212</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>alil</td> </tr> <tr> <td>213</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>trans-propenil</td> </tr> <tr> <td>214</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>trans-propenil</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	Conf.	197	OCH ₃	OCH ₃	H	eritro	198	OCH ₃	OCH ₃	H	treo	199	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	eritro	200	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	treo	201	-O-CH ₂ -O-		H	eritro	202	-O-CH ₂ -O-		H	treo		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Conf	203	OCH ₃	OCH ₃	H	alil	eritro	204	OCH ₃	OCH ₃	H	alil	treo	205	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil	eritro	206	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil	treo	207	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	trans-propenil	eritro	208	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	trans-propenil	treo		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	209	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	alil	210	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	alil	211	-O-CH ₂ -O-		H	OCH ₃	OCH ₃	212	OCH ₃	OCH ₃	H	H	alil	213	OCH ₃	OCH ₃	H	H	trans-propenil	214	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil
	R ₁	R ₂	R ₃	Conf.																																																																																																																								
197	OCH ₃	OCH ₃	H	eritro																																																																																																																								
198	OCH ₃	OCH ₃	H	treo																																																																																																																								
199	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	eritro																																																																																																																								
200	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	treo																																																																																																																								
201	-O-CH ₂ -O-		H	eritro																																																																																																																								
202	-O-CH ₂ -O-		H	treo																																																																																																																								
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Conf																																																																																																																							
203	OCH ₃	OCH ₃	H	alil	eritro																																																																																																																							
204	OCH ₃	OCH ₃	H	alil	treo																																																																																																																							
205	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil	eritro																																																																																																																							
206	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil	treo																																																																																																																							
207	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	trans-propenil	eritro																																																																																																																							
208	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	trans-propenil	treo																																																																																																																							
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅																																																																																																																							
209	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	alil																																																																																																																							
210	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	alil																																																																																																																							
211	-O-CH ₂ -O-		H	OCH ₃	OCH ₃																																																																																																																							
212	OCH ₃	OCH ₃	H	H	alil																																																																																																																							
213	OCH ₃	OCH ₃	H	H	trans-propenil																																																																																																																							
214	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	trans-propenil																																																																																																																							

Tabla 4. Patentes de compuestos o extractos que presentan inhibición enzimática identificado en especies de la familia Myristicaceae.

Patente	Descripción	Enzima	País	Ref.
US 20050267047 A1 20051201	Se refiere a la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por enzimas binucleares. Se incluyen nuevas composiciones compuestas por uno o más diarilalcano(s); que pueden aislarse de una o más fuentes vegetales, entre estos, especies de la familia Myristicaceae, o pueden obtenerse por síntesis orgánica. Incluye métodos para aislar los compuestos de una fuente natural, para sintetizar y un método para prevenir y tratar la sobreproducción de melanina y enfermedades y afecciones de la piel.	Tirosinasa	Estados Unidos	[89]
JP 2004002268 A 20040108	Hace referencia a un inhibidor de la colagenasa como agente de la enfermedad antiperiodontal. El extracto de <i>Myristica argentea</i> de la familia Myristicaceae produce inhibición contra la colagenasa producida por <i>Porphyromonas gingivalis</i> , una bacteria periodontopatógena. El producto tiene un efecto inhibidor sobre la colagenasa generada por el patógeno de la enfermedad periodontal, y puede usarse para prevenir y tratar la enfermedad periodontal.	Colagenasa	Japón	[90]

CONCLUSIONES

Los compuestos fenólicos son una fuente promisoría de metabolitos que producen inhibición enzimática de tipo: acilfenol, lignano, neolignano, flavonoide, alquenilfenol, tocotrienol y ácido fenólico. Los que presentaron mayor número de estudios de inhibición enzimática fueron metabolitos lignano. Los reportes encontrados mostraron el mayor resultado para la actividad antioxidante, estableciendo relación con los compuestos fenólicos que actúan como coadyuvante en dicha actividad. Se encontró

reportes de inhibición enzimática para 24 enzimas de tipos transferasa, hidrolasa y oxidoreductasa. Los organelos que presentaron mayor número de estudios reportados fueron las semillas, que corresponde de igual manera a la especie *Myristica fragrans*. Y los países donde se llevaron a cabo los estudios reportados corresponden a Malasia, Estados Unidos y Corea.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. Harvey, R. Edrada, R. Quinn, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **14**, 111-129 (2015).
2. R. Silverman. M. Holladay. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3rd ed., Academic Press, New York, 2014, pp. 208.
3. C. Ruge, L. Cuca, J. Martínez, Estudio químico y microbiológico del extracto etanólico de las hojas y corteza de *Viola calophylla* (Myristicaceae), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **27**, 33-37 (1998).
4. N. Peporine, D. Siqueira, M. Kato, M. Yoshida, Butanolides as a common feature of *Iryanthera lancifolia* and *Viola surinamensis*, *Phytochemistry*, **49**(5), 1405-1410 (1998).
5. A. Chevallier, *Enciclopedia de plantas medicinales*, Acento, Madrid, 1997, p. 7.
6. The Plant List 2013. URL: <http://www.theplantlist.org/>
7. C. Taylor, W. Devia-Álvarez, La familia de árboles tropicales Myristicaceae en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, *Biota Colomb.*, **1**, 106-108 (2000).
8. M. Ureta, Revisión taxonómica de la familia Myristicaceae de la selva central, Oxapampa - Perú, *Rev. Intrópica*, **5**, 29-36 (2010).
9. C. Boluda, B. Duque, Z. Aragón, Lignanos (I) estructura y funciones en las plantas, *Rev. Fitoter.*, **5**(1), 55-68 (2005).
10. J. Martinez, M. Aldana, L. Cuca, Dibenzylbutane lignans from *Viola sebifera* leaves, *Phytochemistry*, **50**, 883-886 (1999).

11. J. Martínez, L. Cuca, P. Martínez, Lignanos furofuránicos en corteza de *Virola sebifera* (Aublet), *Rev. Colomb. Quím.*, **14**(1-2), 117-125 (1985).
12. V. Rotz, L. Cuca, J. Martínez, Lignanos en hojas de *Virola sebifera*, *Rev. Colomb. Quím.*, **16** (1-2), 51-55 (1987).
13. J. Martínez, L. Cuca, J. Rodríguez, Lignanos en *Osteophloeum sulcatum*, *Rev. Colomb. Quím.*, **23**(2), 9-16 (1994).
14. E. Álvarez, L. Cuca, J. Martínez, Neolignanos en hojas de *Virola calophylla* (Warb), *Rev. Colomb. Quím.*, **14**(1-2), 31-41 (1985).
15. F. Bernal, L. Cuca, Chemical constituents from *Iryanthera ulei* Warb, *Biochem. Syst. Eco.*, **37**, 772-775 (2009).
16. P. Ferri, L. Barata, Neolignans and a phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves, *Phytochemistry*, **31**(4), 1375-1377 (1992).
17. J. Martínez, Distribution of flavonoids in the Myristicaceae, *Phytochemistry*, **55**, 505-511 (2000).
18. E. Almeida, R. Braz, V. Bulow, J. Correa, O. Gottlieb, G. Maia, M. Da Silva, Diarylpropanoids from *Iryanthera polyneura*, *Phytochemistry*, **18**, 1015-1016 (1979).
19. O. Gottlieb, Neolignans from *Virola carinata*, *Phytochemistry*, **15**, 773-774 (1976).
20. M. Kato, M. Yoshida, O. Gottlieb, Flavones and lignans in flowers, fruits and seedlings of *Virola venosa*, *Phytochemistry*, **31**, 283-287 (1992).
21. D. Silva, M. Yoshida, M. Kato, Flavonoids from *Iryanthera sagotiana*, *Phytochemistry*, **46**(3), 579-562 (1997).
22. M. González, M. Pinto, A. Kijjoa, C. Anantachoke, W. Herz, Stilbenes and other constituents of *Knema austrosiamensis*, *Phytochemistry*, **32**(2), 433-438 (1993).
23. J. Martínez, L. Cuca, Flavonoids from *Virola calophylloidea*, *J. Nat. Prod.*, **50**(6), 1045-1047 (1987).
24. N. Franca, P. Díaz, O. Gottlieb, Flavans from *Iryanthera* species, *Phytochemistry*, **13**, 1631-1632 (1974).
25. P. Diaz, A. De Diaz, Diarylpropanes from the wood of *Iryanthera grandis*, *Phytochemistry*, **25**(10) 2395-2397 (1986).

26. R. Braz, M. Da Silva, O. Gottlieb, Flavonoids from *Iryanthera laevis*, *Phytochemistry*, **19**, 1195-1197 (1980).
27. A. Kijjoa, A. Giesbrecht, O. Gottlieb, H. Gottlieb, 1,3-diarilpropanes and propan-2-ols from *Virola* species, *Phytochemistry*, **20**, (6), 1385-1388 (1981).
28. M. Gopalarkishnan, A. Mathews, Proanthocyanidins of nutmeg, *Indian Cocoa Arecanut Species Journal*, **64**, 105, 1983.
29. R. Braz, M. Leite, O. Gottlieb, Constitutions of Diarylpropanoids from *Virola multinervia*, *Phytochemistry*, **12**, 417-419 (1973).
30. J. Martínez, L. Cuca, Dihydrochalconas en corteza de *Iryanthera laevis*, *Rev. Colomb. Quím.*, **18** (1-2), 37-46 (1989).
31. N. Lopes, M. Kato, M. Yoshida, Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*, *Phytochemistry*, **51**, 29-33 (1999).
32. L. Garzón, C. Guarín, J. Martínez, L. Cuca, Estudio químico de la familia Myristicaceae, *Noticias Quím.*, **11**(45), 21-25 (1987).
33. L. Conserva, M. Yoshida, O. Gottlieb, J. Martínez, H. Gottlieb, Iryantherins, Lignoflavonoids of novel structural types from the Myristicaceae, *Phytochemistry*, **29**(12), 3911-3918 (1990).
34. D. Silva, A. Cavalheiro, M. Yoshida, O. Gottlieb, Flavonolignoids from fruits of *Iryanthera grandis*, *Phytochemistry*, **38**(4), 1013-1016 (1995).
35. R. Braz, G. Pedreira, O. Gottlieb, J. Maia, Isoflavones from *Virola caducifolia*, *Phytochemistry*, **15**, 1029-1030 (1976).
36. E. Benavides, *Contribución al Estudio Químico de los Extractos Etanólicos de las Hojas y Corteza de la Especie Virola sp.*, Trabajo de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 1999.
37. E. Blumenthal, M. Da Silva, M. Yoshida, Lignoids, Flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*, *Phytochemistry*, **46**(4), 745-749 (1997).
38. L. Zeng, M. Gu Z, X. Fang, J. McLaughlin, Kneglomeratanol, kneglomeratanones A and B, and related bioactive compounds from *Knema glomerata*, *J. Nat. Prod.*, **57**(3), 376-381 (1994).
39. R. Braz, O. Gottlieb, D. Moraes, G. Pedreira, S. Pinto, Isoflavonoids from Amazonian species, *Lloydia*, **40**(3), 236-238 (1977).

40. L. Cuca, F. Bernal, C. Coy, E. Coy, Essential oil composition and antimicrobial activity of fruits of *Iryanthera ulei* W. from Colombia, *J. Chil. Chem Soc.*, **54**, 363-365 (2009).
41. I. Suffredini, S. De Sousa, S. Frana, H. Suffredini, I. Díaz, M. Paciencia, Multivariate analysis of the terpene composition of *Osteophloeum platyspermum* Warb. (Myristicaceae) and its relationship to seasonal variation over a two-year period, *J. Essent. Oil Bear, Pl.*, **19** (6), 1380-1393 (2016).
42. S. Agurell, B. Holmstedt, J. Lindgren, Alkaloids in certain species of *Virola* and other South American plants of ethnopharmacologic interest, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 903-916 (1969).
43. M. Gonzalez, M. Pinto, A. Kijjoa, S. Kengthong, I. Mondanondra, A. Silva, G. Eaton, W. Herz, 5,7-Dihydroxychromones and 8-hydroxytetrahydrochromones from *Horsfieldia irya*, *Phytochemistry*, **61**, 995-998 (2002).
44. J. Carvalho, L. Ferreira, L. Da Silva Santos, M. Correa, L. Oliveira, J. Bastos, S. Sarti, Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel, *J. Ethnopharmacol.*, **64**, 173-177 (1999).
45. N. Azevedo, S. Santos, E. De Miranda, P. Feri, A 2-acylclohexane-1,3-dione from *Virola oleifera*, *Phytochemistry*, **46**(8), 1375-1377 (1997).
46. C. Hiruma-Lima, L. Batista, A. Albino, L. De Pietro, L. Campaner, W. Vilegas, A. Monteiro, Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae), *J. Ethnopharmacol.*, **122**, 406-409 (2009).
47. T. Elufioye, E. Obuotor, J. Agbedahunsi, S. Adesanya, Cholinesterase inhibitory activity and structure elucidation of a new phytol derivative and a new cinnamic acid ester from *Pycnanthus angolensis*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **26**, 433-437 (2016).
48. M. Abrantes, T. Mil-Homens, N. Duarte, D. Lopes, P. Cravo, M. Madureira, M. Ferreira, Antiplasmodial activity of lignans and extracts from *Pycnanthus angolensis*, *Planta Med.*, **74**, 1408-1412 (2008).
49. M. Oluwatoyin, A. Olubukola, Antinociceptive and antiulcer activities of *Pycnanthus angolensis*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **25**, 252-257 (2015).
50. H. Bandera, A. Anoma, Lignans from *Myristica dactyloides*, *Phytochemistry*, **44**(4), 699-703 (1997).

51. J. Longefosse, E. Nossin, Medical ethnobotany survey in Martinique, *J. Ethnopharmacol.*, **53**, 117-142 (1996).
52. P. Sartorelli, M. Marx Young, M. Kato, Antifungal lignans from the arils of *Virola oleifera*, *Phytochemistry*, **47**, 1003-1006 (1998).
53. B. Patro, A. Bauri, S. Mishra, S. Chattopadhyay, Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6912-6918 (2005).
54. M. Aqmal, Y. Sivasothy, C. Yeng, A. Ablat, J. Mohamad, M. Litaudon, K. Awang, Acylphenols and dimeric acylphenols from *Myristica máxima*, *Fitoterapia*, **111**, 12-17 (2016).
55. L. Barata, L. Santos, P. Ferri, D. Philipson, A. Paine, S. Croft, Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues, *Phytochemistry*, **55**, 589-595 (2000).
56. I. Roth, H. Lindorf, Desarrollo y anatomía del fruto y de la semilla de *Myristica fragrans* Van Houtt, *Acta Bot. Venez.*, **9**(1-4), 149-176 (1974).
57. R. Ramadhan, P. Phuwapraisirisan, New arylkanones from *Horsfieldia macrobotrys*, effective antidiabetic agents concomitantly α -glucosidase and free radicals, *Bioorganic Med. Chem Lett.*, **25**(20), 4529-4533 (2015).
58. N. Al-Mekhlafi, K. Shaari, F. Abas, E. Jeyaraj, J. Stanslas, S. Khalivulla, N. Lajis, New flavan and alkyl α , β -lactones from the stem bark of *Horsfieldia superba*, *Nat. Prod. Commun.*, **8**(4), 447-451 (2013).
59. D. Silva, Y. Zhang, L. Santos, V. Bolzani, M. Nair, Lipoperoxidation and Cyclooxygenases 1 and 2 Inhibitory Compounds from *Iryanthera juruensis*, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2569-2574 (2007).
60. D. Sheng, A. López, B. Hillhouse, C. French, J. Hudson, N. Towers, Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1412-1416 (2002).
61. J. Deng, S. Starck, S. Li, S. Hecht, (+)-Myristinins A and D from *Knema elegans*, which inhibit DNA polymerase β and cleave DNA, *J. Nat. Prod.*, **68**, 1625-1628 (2005).
62. M. Nadeem, K. Wai, F. Abas, S. Maulidiani Ahmad, S. Ali Shad, A. Rahman, M. Choudhary, N. Lajis, New class of acetylcholinesterase inhibitors from the

- stem bark of *Knema laurina* and their structural insights, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **21**, 4097-4103 (2011).
63. F. Fillerur, J. Le Bail, L. Duroux, A. Simon, J. Chulia, Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17 β -HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myristica argentea*, *Planta Med.*, **67**, 700-704 (2001).
 64. S. Abdul, Y. Sivasothy, S. Yee, M. Litaudon, J. Mohamad, K. Awang, Natural cholinesterase inhibitors from *Myristica cinnamomea* King, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **26**, 3785-3792.
 65. S. Sawadjoon, P. Kittakoop, K. Kirtikara, V. Vichai, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, Atropisomeric Myristinins: Selective COX-2 inhibitors and antifungal agents from *Myristica cinnamomea*, *J. Org. Chem.*, **67**, 5470-5475 (2002).
 66. Y. Sivasothy, L. Kong, L. Kok, M. Litaudon, K. Awang, A potent alpha-glucosidase inhibitor from *Myristica cinnamomea* King, *Phytochemistry*, **122**, 265-269 (2015).
 67. A. Maia-Grondard, I. Schmitz-Alfonso, M.-T. Martin, K. Awang, O. Laprevote, F. Gueritte, M. Litaudon, Acylphenols from *Myristica crassa* as new acetylcholinesterase inhibitors, *Planta Med.*, **74**, 1457-1462 (2008).
 68. D. Megawati, S. Fajriah, G. Primahana, R. Triana, M. Minarti, Antioxidant and α -glucosidase activities of benzoic acid derivate from the bark of *Myristica fatua* Houtt, *AIP Conference Proceedings*, **020027**(1-5), 2017.
 69. G. Cao, X. Yang, W. Xu, F. Li, New inhibitors of nitric oxide production from the seeds of *Myristica fragrans*, *Food Chem. Toxicol.*, **62**, 167-171 (2013).
 70. A. El-Alfy, S. Joseph, A. Brahmabhatt, S. Akati, E. Abourashed, Indirect modulation of the endocannabinoid system by specific fractions of nutmeg total extract, *Pharm. Biol.*, **54**, 2933-2938 (2016).
 71. K. Hyun Shin, O. Nam Kim, W. Sick Woo, Isolation of hepatic drug metabolism inhibitors from the seeds of *Myristica fragrans*, *Arch. Pharmacol Res.*, **11**(3), Article 240 (1988).
 72. P. Jaiswal, P. Kumar, V. Singh, D. Singh, Enzyme inhibition by molluscicidal components of *Myristica fragrans* Houtt, in the nervous tissue of Snail *Lymnaea acuminata*, *Enzyme Res.*, **47874**, 1-6 (2010).

73. B. Jiang, Y. Liang, X. Sun, X. Liu, W. Tian, X. Ma, Potent inhibitory effect of Chinese dietary spices on fatty acid synthase, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **70**, 257-262 (2015).
74. J. Kang, N. Tae, B. Sun, J. Choe, J. Hyung, Malabaricone C suppresses lipopolysaccharide - induced inflammatory responses via inhibiting ROS-mediated/AKT/IKK/NF- κ B signaling in murine macrophages, *Int. Immunopharmacol.*, **14**, 302-310 (2012).
75. K. Lee, J. Kim, J. Cho, J. Choi, Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **21**, 71-82 (1999).
76. E. Martati, R. Boonpawa, J. Berg, A. Paini, A. Spengelink, A. Punt, I. Rietjens, Malabaricone C-containing mace extract inhibits safrole bioactivation and DNA adduct formation both *in vitro* and *in vivo*, *Food Chem. Toxicol.*, **66**, 373-384 (2014).
77. U. Muñoz, P. Blanco, S. Matthew, E. Carcache, New acyclic bis phenylpropanoid and neolignans, from *Myristica fragrans* Houtt., exhibiting PARP-1 and NF-KB inhibitory effects, *Food Chem.*, **202**, 269-275 (2016).
78. T. Thi, W. Keun, P. Hung, S. Jeong, M. Yeol, K. Wook, Nectandrin B activates endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in endothelial cells: Role of the AMP-activated protein kinase/estrogen receptor α /phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway, *Mol. Pharmacol.*, **80**, 1166-1178 (2011).
79. M. Sharma, M. Kumar, Radioprotection of Swiss albino mice by *Myristica fragrans* houtt, *J. Radiat. Res.*, **48**, 135-141 (2007).
80. S. Yang, M. Na, J. Jang, K. Ah Kim, B. Yeon, N. Sung, W. Keun, J. Seog, Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lignans from *Myristica fragrans*, *Phytother. Res.*, **20**(8), 680-682 (2006).
81. YANTI, Inhibition of urokinase-type plasminogen activator expression by mace-lignan in Porphyromonas gingivales supernatant-induced human oral epithelial cells, *HAYATI J. Biosci.*, **17**(1), 31-37 (2010).
82. D. Banerjee, A. Bauri, R. Guha, S. Bandyopadhyay, S. Chattopadhyay, Healing properties of malabaricone B and malabaricone C, against indomethacin-induced gastric ulceration and mechanism of action, *Eur. J. Pharmacol.*, **578** 300-312 (2008).

83. F. Khanom, H. Kayahara, K. Tadasa, Superoxide-scavenging and prolyl endopeptidase inhibitory activities of Bangladeshi indigenous medicinal plants, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(4), 837-840 (2000).
84. V. Kuete, E. Nono, P. Mkounga, K. Marat, P. Hultin, A. Nkengfack, Antimicrobial activities of the CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1) extracts and compounds from the roots and fruits of *Pycnantus angolensis* (Myristicaceae), *Nat. Prod. Res.*, **25**(4), 432-443 (2011).
85. T. Mansoor, R. Ramalho, C. Rodriguez, M. Ferreira, Dibenzylbutane and butyrolactone-type lignans as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells, *Phytother. Res.*, **26**, 692-696 (2012).
86. A. Tchinda, M. Tchuendem, S. Khan, I. Omar, F. Ngandeu, P. Nkeng, I. Choudhary, Antioxidant activity of the crude extract of the fruits of *Pycnantus angolensis* and α -glucosidase inhibitory activity of its constituents, *Pharmacol. Online*, **1**, 422-431 (2008).
87. D. McKenna, G. Towers, F. Abbott, Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants. Part 2: Constituents of orally active Myristicaceous hallucinogens, *J. Ethnopharmacol.*, **12**, 179-211 (1984).
88. S. Zacchino, G. Rodriguez, C. Santecchia, G. Pezzenati, F. Gianninni, R. Enriz, *In vitro* studies on mode of action of antifungal 8.O.4'-neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of Myristicaceae, *J. Ethnopharmacol.*, **62**, 35-41 (1998).
89. Q. Jia, J. Zhao, *Diarylalkanes as potent inhibitors of binuclear enzymes*, Estados Unidos, US 2014/0371491 A1 (2014).
90. E. Kunitomo, *Inhibidor de colagenasa y uso del mismo*, Japón, JP 2004002268 A 20040108, (2004).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

X.A. Cabrera-Martínez, L.E. Cuca-Suarez, Metabolitos secundarios aislados de especies de la familia Myristicaceae que producen inhibición enzimática, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 352-385 (2021).

Study of the use of IVIG Normal Human Immunoglobulin in the La Samaritana University Hospital during the period of 2017-2019

Lizeth Daniela Quiroga Robayo¹, Mónica Patricia Montaña Avila², José Julián López Gutiérrez³

¹Estudiante de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

Corresponding author: ldquirogar@unal.edu.co

²Grupo de investigación INFARMA, Hospital Universitario de la Samaritana, Cra 8 N.º 0-29 sur, Bogotá, Colombia.

³Grupo RAM (Red para el uso Adecuado de Medicamentos), Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra. 30 N.º 45-03, Bogotá D. C., Colombia.

Received: September 8, 2020

Corrected: February 2, 2021

Accepted: February 5, 2021

SUMMARY

Introduction: Non-specific intravenous human immunoglobulin (IVIG) is a valuable therapeutic resource in specific pathologies, however, there are pathological conditions for which there is not yet a defined therapeutic strategy and due to similarity or biological plausibility, some prescribers end up using it. **Aim:** To identify the indications for which IVIG has been prescribed in the HUS, **Methodology:** A descriptive observational cross-sectional study was performed with retrospective collection of information between January 1, 2017, and December 31, 2019. **Materials and methods:** 180 medical records were reviewed, demographic characterization of the study, clinical and pharmacological population of patients who have been prescribed at least one dose of immunoglobulin. In addition, the indications proposed in the clinical history were compared with the indications approved by regulatory authority (Invima). **Results:** It was determined that the population with the highest predominance to which IVIG was prescribed in the HUS, were women in young adulthood. Likewise, the use of IVIG presented a higher frequency in patients with idiopathic purple thrombocytopenia (ITP), Guillain-Barré Syndrome (GBS), Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and neonatal jaundice due to other existing hemolysis specified as main diagnoses. The indications for which there is an Invima approval are nonspecific, which means that there is no defined therapeutic strategy with IVIG and therefore that prescribers for similarity or biological plausibility turn out to be using it, for uses not indicated in the

sanitary registry (UNIRS), which represented 71 % of indications for which IVIG was prescribed in HUS. **Conclusion:** The indications for the most prescription with IVIG were idiopathic purple thrombocytopenia (ITP) and Guillain-Barré syndrome (GBS). The non-prescribed use of IVIG in this study reached a figure of 71%.

Keywords: Non-specific intravenous human immunoglobulin (IVIG), drug utilization, off-label use.

RESUMEN

Estudio de utilización de Inmunoglobulina Humana Normal IGIV en el Hospital Universitario de la Samaritana durante el periodo de 2017-2019

Introducción: la inmunoglobulina humana intravenosa inespecífica (IGIV) es un valioso recurso terapéutico en patologías específicas, sin embargo, existen condiciones patológicas para las que aún no existe una estrategia terapéutica definida y por similitud o plausibilidad biológica algunos prescriptores terminan usándola. **Objetivo:** identificar las indicaciones para las cuales se ha prescrito inmunoglobulina humana inespecífica intravenosa (IGIV) en el HUS. **Metodología:** se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal con recolección retrospectiva de la información entre enero 1 de 2017 hasta diciembre 31 de 2019. **Materiales y métodos:** se revisaron 180 historias clínicas, de pacientes a quienes se le prescribió al menos una dosis de inmunoglobulina, se realizó una caracterización demográfica, clínica y farmacológica de la población estudio. Además, se comparó las indicaciones descritas en la historia clínica con las indicaciones aprobadas por el Invima. **Resultados:** se identificó a mujeres adultas jóvenes como población a quienes se le prescribió IGIV con mayor frecuencia. Asimismo, las indicaciones para la que se prescribe IGIV con mayor frecuencia fueron la purpura trombocitopenia idiopática (PTI), síndrome de Guillain-Barré (SGB), lupus eritematoso sistémico (LES) e ictericia neonatal debida a otras hemolisis existentes. Las indicaciones aprobadas por la agencia regulatoria colombiana (Invima) son inespecíficas por lo que el uso de la IGIV es prescrito ya sea por similitud o plausibilidad biológica, lo cual puede explicar el uso no prescrito que en este estudio alcanzó la cifra del 71%. **Conclusión:** las indicaciones de mayor prescripción con IGIV fue purpura trombocitopenia idiopática (PTI) y síndrome de Guillain-Barré (SGB). El uso no prescrito de IGIV en este estudio alcanzó la cifra del 71%.

Palabras clave: Inmunoglobulina humana inespecífica intravenosa (IGIV), utilización de medicamentos, uso fuera de lo indicado.

RESUMO

Estudo de utilização de Imunoglobulina Humana Intravenosa Inespecífica (IGIV) no Hospital Universitário da Samaritana (HUS) durante o período 2017-2019

Introdução: a imunoglobulina humana intravenosa inespecífica (IGIV) é um recurso terapêutico valioso em patologias específicas, porém existem condições patológicas para as quais ainda não há estratégia terapêutica definida e devido à semelhança ou plausibilidade biológica alguns prescritores acabam por indica-la. **Objetivo:** identificar as indicações para as quais a imunoglobulina humana intravenosa inespecífica (IGIV) foi prescrita no HUS. **Metodologia:** foi realizado um estudo observacional transversal descritivo com coleta retrospectiva de informações entre 1º de janeiro de 2017 e 31 de dezembro de 2019. **Materiais e métodos:** foram revisados 180 prontuários de pacientes que receberam prescrição de pelo menos uma dose de imunoglobulina, foi realizada uma caracterização demográfica, clínica e farmacológica da população em estudo. Além disso, as indicações descritas no prontuário foram comparadas com as indicações aprovadas pelo Invima. **Resultados:** mulheres adultas jovens foram identificadas como a população que recebeu IGIV com maior frequência. Da mesma forma, as indicações para as quais a IGIV foi mais frequentemente prescrita foram trombocitopenia roxa idiopática (PTI), síndrome de Guillain-Barré (SGB), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e icterícia neonatal devido a outras hemólises existentes. As indicações aprovadas pela agência reguladora colombiana (Invima) são inespecíficas, portanto o uso de IGIV é prescrito seja por semelhança ou plausibilidade biológica, o que pode explicar o uso off label, que neste estudo atingiu a cifra de 71%. **Conclusão:** as indicações para a maior prescrição de IGIV foram a trombocitopenia roxa idiopática (PTI) e a síndrome de Guillain-Barré (SGB). O uso off label de IGIV neste estudo atingiu a cifra de 71%.

Palavras-chave: Imunoglobulina humana inespecífica intravenosa (IVIG), uso de medicamentos, uso off-label.

INTRODUCTION

Non-specific intravenous human immunoglobulin (IVIG) is a valuable therapeutic resource in pathologies such as primary and secondary immunodeficiencies, autoimmune diseases, neurological disorders, infections, transplants, and others in which its efficacy has been demonstrated [1]. However, there are pathological conditions for

which there is not yet a defined therapeutic strategy and due to similarity or biological plausibility some prescribers end up using it. Currently in Colombia, the Food and Drug Surveillance Institute (Invima by its initials in Spanish) has approved 39 registries in force or in the process of renewal and it is indicated for the replacement treatment in primary immunodeficiency, secondary immunodeficiency, congenital HIV, hypogammaglobulinemia ($< 4 \text{ g/L}$) in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and immunomodulation: Primary immune thrombocytopenia, Guillain Barré syndrome, and Kawasaki disease [2].

IVIG is a derivative of plasma from healthy donors, composed mainly of human immunoglobulin G (IgG), with small amounts of IgA and IgM. Being a group of different donors, it guarantees a diversified collection of antibodies with variable antigen binding regions. All samples are tested mainly for human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B, and hepatitis C [3]. IVIG is currently used to provide immediate passive immunity after suspected exposure to an organism for which there is no active immunization or if there is an inappropriate time to develop active immunization, and as replacement therapy for patients with antibody deficiencies. It has also been used successfully to treat immune thrombocytopenic purpura (ITP), Kawasaki syndrome (mucocutaneous lymph node syndrome), and chronic demyelinating inflammatory polyneuropathies (PDIC). [4] The therapeutic doses used vary from substitute doses (200-400 mg/kg weight) in immunodeficiencies; up to high doses (1-2 g/kg of weight) in autoimmune or inflammatory diseases [5]. The most common adverse reactions to IVIG are thrombocytopenia, hypersensitivity reactions, acute renal failure, increased serum viscosity, and hyponatremia. Discontinuation of IVIG treatment has resulted in remission of aseptic meningitis syndrome (AMS) [6].

Grouped heterogeneous IgG in IVIG provides many antibodies capable of opsonization and neutralization of infectious agents, as well as complement activation. Fc fragment of IgG molecule allows the molecule to interact through the Fc-gamma receptor in B cells and other cells of the phagocytic system. Fc fragment also interacts with plasma Fc-binding proteins. This interaction is essential for the activation of the complement and the elimination of microorganisms. In states of immunomodulatory and anti-inflammatory disease, it is believed that the Fc fragment of IgG and the Fc-gamma receptors on target cells, cells of the phagocytic system, interact to enhance or negatively regulate inflammatory and immune responses. In autoimmune cytopenia and inflammatory neurological disorders, blocking of Fc-gamma receptors in macrophages blocks the elimination of opsonized target cells and suppresses antibody-dependent cellular cytotoxicity, respectively. Immunoglobulins can also modulate the inflammatory response by preventing tissue damage mediated by the complement and regulating the induction of anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists. The immunomodulatory

response may be facilitated by the immunoregulatory effects of antidiotypic antibodies on B cells and autoantibodies, regulation of T helper cell production, and apoptosis of gene expression in the immune system [4, 5].

The improvement in the IVIG production parameters, according to the purity criteria required by the WHO, has been one of the factors that contributes to an increase in its clinical use despite the limited number of authorized indications [5]. However, in the country there is limited information about the profile of the IgG use that identifies the conditions under which it is opting for its selection. A search in the different electronic databases Science Direct, Medline, PubMed, Clinical key and up-to-date, only found a practical clinical guide for intravenous use of immunoglobulin (IVIG) published in a Mexican journal by a group of experts from different institutions [1]. A report was found related with the budgetary impact of the IVIG use carried out by several entities of the Colombian government [7] and, finally, other efficacy and safety studies, which supports the limited information on the use profile.

From the last report by Invima (February 2020) about the risk of shortage of immunoglobulin solution for injection, influenced by local over-demand (monthly consumption: 11 000 units. SISMED, 2019) [8], added to the increase in consumption of high-cost drugs in Colombia [9], the high price per unit (about COP \$ 700 698), the high value that La Samaritana University Hospital has invested in its acquisition in the last three years (about COP \$ 3 522 863 045), and, as there is a limited number of authorized indications for which a clinical use of IVIG is made. It is necessary to study the behavior in the prescription of this medicine so that an overview of its use is obtained.

METHODOLOGY

Descriptive observational cross-sectional study with retrospective collection of information was performed from January 1, 2017, to December 31, 2019. The present study was carried out over a period of three years (time point) in order to obtain an adequate sample size, which was analyzed in a single period of three years. It is not considered a longitudinal design since a temporal sequence was not established.

The study included all the medical records of patients who were prescribed at least one dose of IVIG during the study period and excluded those where it was not possible to obtain the weight of the patient. A demographic characterization of the population—clinical and pharmacological—was performed, and the indications proposed in the medical record were compared with the indications approved by Invima described

in table 1. Coding and classification of diagnoses and comorbidities were used in the ICD-10 manual provided by WHO.

Table 1. Collection of Invima indications about IVIG.

Therapeutic objective	Indication
Replacement or substitution therapy	Primary humoral immunodeficiencies. Secondary immunodeficiency. Congenital Hypogammaglobulinemia. Congenital Agammaglobulinemia. Hypogammaglobulinemia (<4 g/l) in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation . Common variable immunodeficiency. Severe combined immunodeficiency.
Immunomodulation	Idiopathic thrombocytopenic purpura. Guillain-Barré syndrome. Kawasaki disease. Immune thrombocytopenia. Congenital AIDS. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Multiple relapse.
Others	Wiskott-Aldrich syndrome. Myeloma or chronic lymphocytic leukemia with severe secondary hypogammaglobulinemia and recurrent infections. Correct your platelet count before surgery. Postpartum remission. Adjuvant in the management of multifocal motor neuropathy.

For the analysis, the statistical tools of the Microsoft Excel® electronic sheet were used. Frequencies were estimated from the different quantitative and qualitative variables that were described in tables and percentage terms. The use of patient information was approved for ethic committee in research according to the record of the meeting 04-2020.

RESULTS

Information was obtained from 182 medical records, two were discarded because of the lack of information on their weight made it impossible to determine the dose (g/kg/day). Due to the wide age range, the population was described according to the classification by stages of development: IVIG was prescribed to people in early childhood (0-5 years), adolescence (12-17 years), early adulthood (18-40 years), middle

adulthood (41-60 years) and late adulthood (61 years and older). The proportion of women was higher representing 56% (100/180). The use was predominant in women in early adulthood representing 27.8% (50/180). Other results can be found in figure 1.

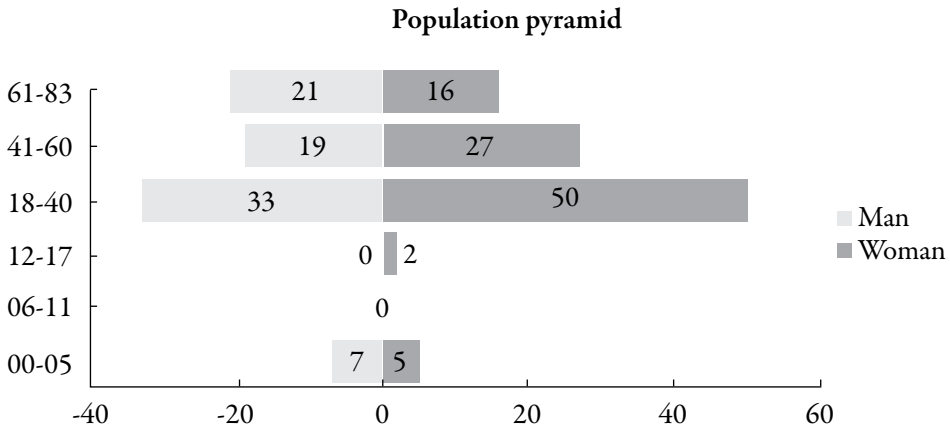


Figure 1. Population pyramid of IVIG prescription at HUS.

The diagnosis compilation, according to ICD-10, can be seen in table 2, where most of the indications are grouped in diseases of the blood, hematopoietic organs and other disorders that affect the mechanism of immunity and diseases of the nervous system, mainly idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and Guillain-Barre syndrome (GBS), which could be determined by defining the number of patients by disease and individualized diagnosis.

Table 2. Main diagnosis according to the international statistical classification of diseases and problems related to health (ICD-10) -WHO.

Category	Title	Code	Diagnosis	N.º Patients/DX	N.º Patients/Category
A00-B99	Certain infectious and parasitic diseases	A419	Sepsis, unspecified	1	2
		B24X	Unspecified human immunodeficiency virus [HIV] disease	1	

(Continued)

Category	Title	Code	Diagnosis	N.° Patients/ DX	N.° Patients/ Category
C00-D48	Neoplasms	C845	Other mature T/NK-cell lymphomas	1	3
		C900	Multiple myeloma	1	
		D469	Myelodysplastic syndrome, unspecified	1	
D50-D89	Diseases of the blood and blood-forming organs and certain disorders involving the immune mechanism	D693	Idiopathic thrombocytopenic purpura	21	78
		D696	Thrombocytopenia, unspecified	13	
		D591	Other autoimmune haemolytic anaemias	10	
		D695	Secondary thrombocytopenia	6	
		D649	Anaemia, unspecified	5	
		D800	Hereditary hypogammaglobulinaemia	5	
		D694	Other primary thrombocytopenia	5	
		D598	Other acquired haemolytic anaemias	2	
		D589	Hereditary haemolytic anaemia, unspecified	2	
		D648	Other specified anaemias	2	
		D594	Other nonautoimmune haemolytic anaemias	1	
		D590	Drug-induced autoimmune haemolytic anaemia	1	
		D688	Other specified coagulation defects	1	
		D838	Other common variable immunodeficiencies	1	
		D588	Other specified hereditary haemolytic anaemias	1	
D729	Disorder of white blood cells, unspecified	1			
D510	Vitamin B12 deficiency anaemia due to intrinsic factor deficiency	1			

(Continued)

Category	Title	Code	Diagnosis	N.º Patients/ DX	N.º Patients/ Category
G00-G89	Diseases of the nervous system	G610	Guillain-Barré syndrome	33	58
		G619	Inflammatory polyneuropathy, unspecified	4	
		G724	Inflammatory myopathy, not elsewhere classified	3	
		G700	Myasthenia gravis	3	
		G629	Polyneuropathy, unspecified	3	
		G729	Myopathy, unspecified	3	
		G048	Other encephalitis, myelitis, and encephalomyelitis	2	
		G370	Diffuse sclerosis	2	
		G628	Other specified polyneuropathies	1	
		G049	Encephalitis, myelitis, and encephalomyelitis, unspecified	1	
		G728	Other specified myopathies	1	
		G588	Other specified mononeuropathies	1	
G731	Lambert-Eaton syndrome	1			
H60-H95	Diseases of the ear and mastoid process	H903	Sensorineural hearing loss, bilateral	1	2
		H814	Vertigo of central origin	1	
K00-K93	Diseases of the digestive system	K922	Gastrointestinal haemorrhage, unspecified	2	2
L00-L99	Diseases of the skin and subcutaneous tissue	L100	Pemphigus vulgaris	3	8
		L512	Toxic epidermal necrolysis [Lyell]	2	
		L270	Generalized skin eruption due to drugs and medicaments	1	
		L988	Other specified disorders of skin and subcutaneous tissue	1	
		L102	Pemphigus foliaceus	1	

(Continued)

Category	Title	Code	Diagnosis	N.º Patients/ DX	N.º Patients/ Category
M00-M99	Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue	M329	Systemic lupus erythematosus, unspecified	8	15
		M321	Systemic lupus erythematosus with organ or system involvement	5	
		M609	Myositis, unspecified	1	
		M331	Another dermatomyositis	1	
N00-N99	Diseases of the genitourinary system	N939	Abnormal uterine and vaginal bleeding, unspecified	1	1
P00-P96	Certain conditions originating in the perinatal period	P588	Neonatal jaundice due to other specified excessive haemolysis	4	10
		P590	Neonatal jaundice associated with preterm delivery	2	
		P559	Haemolytic disease of fetus and newborn, unspecified	1	
		P589	Neonatal jaundice due to excessive haemolysis, unspecified	1	
		P598	Neonatal jaundice from other specified causes	1	
		P599	Neonatal jaundice, unspecified	1	
R00-R99	Symptoms, signs and abnormal clinical and laboratory findings, not elsewhere classified	R13X	Dysphagia	1	1

The most frequent indication in 2017 was GBS, followed by ITP, unspecified thrombocytopenia, secondary thrombocytopenia, and systemic lupus erythematosus (SLE). In 2018, GBS also predominated, followed by other autoimmune hemolytic anemias, unspecified thrombocytopenia, inflammatory polyneuropathy, neonatal jaundice due to other excessive hemolysis, and ITP. Finally, in 2019, there was a variation in which ITP was the main diagnosis, continued by GBS, hereditary hypogammaglobulinemia, myopathy, other autoimmune hemolytic anemias and SLE.

The service where most IVIG prescriptions appeared was hospitalization with 54% (98/180), followed by the emergency service with 46% (82/180). Regarding the medical specialty, the internist was identified as the highest IVIG prescriber with 28% (51/180) followed by the hematologist with 27% (50/180), and the one who prescribed the least frequently was the general surgeon with 0.5% (1/180).

Regarding the comorbidities, they were absent in 24% (38/180) of the patients, 35% (56/180) presented a comorbidity, 28% (46/180) presented two comorbidities, and 13% (20/180) presented three comorbidities. The most frequent pathological condition was SLE, followed by unspecified polyneuropathy. As the second comorbidity, the most prevalent was essential (primary) hypertension, followed by unspecified thrombocytopenia. Dysphagia was identified as the third comorbidity, followed by unspecified sepsis.

Table 3 shows the different doses prescribed as well as the number of patients who were under this management plan. The most frequently prescribed dose was 1 g/kg/day for 2 days, followed by 0.4 g/kg/day for 5 days and 1 g/kg/day for 3 days.

Table 3. Dose in which IVIG was prescribed.

Dose (g/kg/día)	Time (days)	Patients
1	2	75
	3	12
	5	1
2	1	1
	2	1
	3	1
	5	5
	1.5	1
0.2	5	1
0.4	1	5
	5	73
0.5	1	2
	2	1
	1.5	1

The most frequent diagnosis for the dose of 1 g/kg/day for 2 days was ITP, followed by unspecified thrombocytopenia and other autoimmune hemolytic anemias. For 0.4 g/kg/day in 5 days it was GBS, followed by SLE and inflammatory polyneuropathy.

Finally, for the dose of 1 g/kg/day in 3 days, the indication of greater prevalence was also ITP, followed by SLE and unspecified thrombocytopenia, however, it should be mentioned that this last dose was the most widely used in the early childhood population, particularly neonates.

Regarding concomitant medication, it was identified that 5% (9/180) of the patients have IVIG as the only treatment, 24% (43/180) have prescribed an additional medication to IVIG, 25% (45/180) have prescribed two concomitant medications and lastly 46% (83/180) consume three additional medications to IVIG. The most frequently medicine used concomitantly are corticosteroids (methylprednisolone, prednisone, and prednisolone) followed by chloroquine, folic acid, and azathioprine.

Regarding the agreement with the Invima indications, table 4 shows that 29% (16/55) of the diagnoses for which IVIG was prescribed is in accordance with the approval of this regulatory entity and 71% (39/55) are off label uses, which in Colombia are known as Uses not indicated in the Sanitary Registry (UNIRS).

Table 4. Invima approval (yes / no) of the diagnoses in which IVIG was prescribed.

Diagnoses	Approval Invima	
	Yes	No
Guillain-Barré syndrome	X	
Idiopathic thrombocytopenic purpura	X	
Thrombocytopenia, unspecified		X
Other autoimmune haemolytic anaemias		X
Systemic lupus erythematosus, unspecified		X
Secondary thrombocytopenia		X
Hereditary hypogammaglobulinaemia	X	
Systemic lupus erythematosus with organ or system involvement		X
Anaemia, unspecified		X
Other primary thrombocytopenia	X	
Neonatal jaundice due to other specified excessive haemolysis		X
Inflammatory polyneuropathy, unspecified	X	
Myasthenia gravis		X
Pemphigus vulgaris		X
Inflammatory myopathy, not elsewhere classified		X
Polyneuropathy, unspecified		X

(Continued)

Diagnoses	Approval Invima	
	Yes	No
Myopathy, unspecified		X
Diffuse sclerosis		X
Neonatal jaundice associated with preterm delivery		X
Other acquired haemolytic anaemias		X
Gastrointestinal haemorrhage, unspecified		x
Other encephalitis, myelitis and encephalomyelitis		X
Toxic epidermal necrolysis [Lyell]		X
Hereditary haemolytic anaemia, unspecified	X	
Other specified anaemias	X	
Other mature T/NK-cell lymphomas	X	
Lambert-Eaton syndrome	X	
Unspecified human immunodeficiency virus [HIV] disease		X
Sensorineural hearing loss, bilateral		X
Vitamin B12 deficiency anaemia due to intrinsic factor deficiency	X	
Dysphagia		X
Pemphigus foliaceus		X
Encephalitis, myelitis, and encephalomyelitis, unspecified		X
Drug-induced autoimmune haemolytic anaemia		X
Neonatal jaundice due to excessive haemolysis, unspecified		X
Myelodysplastic syndrome, unspecified	X	
Other specified hereditary haemolytic anaemias	X	
Vertigo of central origin		X
Other nonautoimmune haemolytic anaemias		X
Other specified disorders of skin and subcutaneous tissue		X
Other dermatomyositis		X
Neonatal jaundice, unspecified		X
Haemolytic disease of fetus and newborn, unspecified		X
Generalized skin eruption due to drugs and medicaments		X
Other common variable immunodeficiencies	X	
Sepsis, unspecified		X
Other specified myopathies		X
Multiple myeloma	X	

(Continued)

Diagnoses	Approval Invima	
	Yes	No
Other specified mononeuropathies		X
Disorder of white blood cells, unspecified	X	
Other specified polyneuropathies	X	
Abnormal uterine and vaginal bleeding, unspecified		X
Neonatal jaundice from other specified causes		X
Myositis, unspecified		X
Other specified coagulation defects	X	

DISCUSSION

Regarding the sex and age, more than half of the patients in this study are young women of productive age, which agrees on the epidemiological data of autoimmune diseases such as SLE, polyomyositis [10]. However, in nervous diseases such as chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), it is more common in the fifth and sixth decade of life [11]. This, when compared with other results of the study, also reflects a significant percentage of prescribed patients with IVIG between 41 and 60 years. It is worth mentioning that both SAD and CIDP are part of the diagnoses in which IVIG is prescribed in the institution.

Regarding the analysis of the diagnoses that justified the use of immunoglobulin during this period, it can be detailed that the main diagnosis was GBS. However, the frequency of use is grouped in the treatment of patients mainly with diseases of the blood and hematopoietic organs and other disorders that affect the immunity mechanism, particularly the diagnosis of ITP, followed by nervous diseases, led by GBS, already mentioned above, and then by diseases of the musculoskeletal system and connective tissue, in which the main diagnosis was SLE. Finally, certain conditions of the perinatal period, in which there was a higher prevalence of the population in neonatal jaundice due to other specified excessive hemolysis. These diagnoses explain that specialties with the highest incidence of prescriptions were internal medicine, hematology, and neurology.

The main indications for IVIG treatment are some of the primary immunodeficiencies and secondary immunodeficiencies that include a significant antibody deficiency, where they are used as replacement therapy [12]. This also coincides with the frequencies obtained, since these are grouped within the category of diseases of the blood and of hematopoietic organs and other disorders that affect the mechanism of immunity.

These included hereditary hypogammaglobulinemia, hereditary hemolytic anemia, specified coagulation defects, common variable immunodeficiencies, specified hereditary hemolytic anemias, leukocyte disorders, anemia due to vitamin B12 deficiency because of intrinsic factor deficiency, among others. Thus, it was the category that presented the largest population in which use of IVIG.

ITP is an acquired autoimmune disease with a highly variable clinical course, which makes its diagnosis, treatment and follow-up depend on the situation of the patient. In general, the first line treatment is glucocorticoids, however, the use of IVIG is indicated as first line treatment in cases of severe active bleeding, when glucocorticoid treatment is contraindicated, when an immediate rise in platelet count is required, and as an adjunctive treatment if monotherapy fails. This is why it is usually used together with methylprednisolone, the most frequent concomitant medication among the patients evaluated. The dose recommended by the clinical practice guideline is 1 g/kg/day for 2 days, which is consistent with the findings of this study [13].

Regarding GBS, plasmapheresis and administration of IVIG at a dose of 0.4 g/kg/day for 5 days are among the indicated treatments [10], which was the most predominant dose in the study for this diagnosis. In addition to this, a pilot study demonstrated that the combination of intravenous immunoglobulin and methylprednisolone could be beneficial in accelerating recovery from neurological disability in patients with Guillain-Barré syndrome [14]. Again, this glucocorticoid behaves as a concomitant medication within the treatment for these autoimmune disorders, which explains the prevalence of its use within the study population.

Another common diagnosis in the study population was SLE, for which only the management of exacerbations and symptoms—which arise as side effects—ensuring an acceptable quality of life is recommended. There is a variety of treatments, among them is the use of corticosteroids for pain and fatigue, which, within the study, are the drugs of greatest concomitant use with IVIG. Likewise, associations such as dermatitis and arthritis sometimes respond to antimalarials, among them the most widely used are chloroquine sulfate and hydroxychloroquine, which, when observing the results, is part of the concomitant medications of patients. Serious manifestations of SLE should be treated with high doses of corticosteroids such as prednisone, prednisolone (1-2 mg/kg/day) in divided doses. After the active phase has been controlled for several days in a single morning dose, doses are decreased as rapidly as the clinical situation allows. Cytotoxic agents (azathioprine, chlorambucil, cyclophosphamide, methotrexate) are useful to control active disease and reduce exacerbations and steroid needs, and, on the other hand, azathioprine also have a high prevalence reflected within the results found [14].

IVIG or plasmapheresis may be indicated in cases of lupus nephritis, pancytopenia, and resistant thrombocytopenia, among others. These comorbidities were common findings for these patients, since the use of IVIG in patients with SLE was based on unspecified thrombocytopenia that caused relapses in these patients, this explains that this pathology behaved as the main diagnosis and main comorbidity. The usual immunomodulatory dose of IVIG in SLE is 1 to 2 g/kg/day [15].

In hemolytic incompatibility disease ABO is one of the most frequent causes in indirect hyperbilirubinemia or also known as jaundice due to other specified excessive hemolysis. The treatment of choice is plasmapheresis and exchange transfusion, however the use of high doses of intravenous immunoglobulin has been extended for patients with Rh isoimmunization or ABO, since it has been determined that it reduces the need for exchange transfusion, the duration of phototherapy and the length of hospital stay, it is an alternative of great benefit. The current recommendation on the use of immunoglobulin is to administer 0.5 to 1 g/kg in neonates with hemolytic disease if the level of total serum bilirubin is increasing despite intensive phototherapy or if the level of total serum bilirubin is at 2 mg/dL or 3 mg/dL of the exchange transfusion level. This is determined according to gestational age and postnatal age, and it is accepted to repeat the dose in 12 hours, if necessary, which are two dose regimens that were used in neonates within the institution. The duration or repetition of the established dose depended on the evolution of the patient observing neonatology, which is a procedure to be carried out according to clinical practices [16].

In addition to the immunomodulators previously mentioned within the management plan for the different diagnoses, it is also important to recognize the frequency of the use of folic acid within this population, this can be associated with the prevention of folate deficiency secondary to chronic hemolysis [17], such as those who manifested autoimmune hemolytic anemia or relapse of SLE. It should be clarified that IVIG is not a first-line treatment since there are other alternatives such as corticosteroids and plasmapheresis, therefore, regarding pharmacological management, it is observed that the percentage of patients under treatment with IVIG alone is very low.

Regarding comorbidities, the number of patients without pathologies is important according to the sample. Among the patients with comorbidities, it was possible to identify that the manifestations found are due to complications of the main diagnosis, for example pancytopenia, thrombocytopenia and hemolytic anemia are a frequent and potentially serious complication in systemic autoimmune diseases [18] or inflammatory polyneuropathy and dysphagia, complications of GBS. High blood pressure as comorbidity is probably not associated with the main diagnosis, but rather with its

prevalence in the world population since it was not described in the medical record as secondary high blood pressure.

Regarding the approval of Invima indications, of the diagnoses for which the use of IVIG was justified, it was difficult to determine because the uses authorized by this entity are not specific. Although it delimits the authorized diagnoses as first choice treatment, it is not clear in the main alterations to be used as a second-choice treatment or as an aid in the management plan, which causes a degree of freedom and individualization of the use of this medicine by the prescribing service or prescribing specialty, based on international clinical practice guidelines. Therefore, the UNIRS percentage of IVIG in the HUS was 71%, which is a significant value in which the country is at risk of shortages of IVIG and, without a study that allows visualizing the general panorama of Colombia, the uneasiness about a common denominator in the different institutions that offer this treatment within the patient management plan appears. This in turn, in the short or medium term can generate a public health problem in the country, because the supply of this medicine is not achieved for those patients who require this first choice treatment, as a vital necessity.

The most predominant population prescribed IVIG was young adult women in indications related to diseases of the blood and hematopoietic organs and other disorders that affect the mechanism of immunity, nervous diseases, diseases of the musculoskeletal system, connective tissue, and certain conditions of the perinatal period.

Patients with autoimmune diseases within the study were characterized by having only the diagnosis that justified the use of IVIG or, more frequently, they had comorbidities such as SLE, polyneuropathy and unspecified thrombocytopenia, complications of the main diagnosis.

The diagnoses for which there is an Invima approval are not specific, which implies that there is not a defined therapeutic strategy with IVIG and therefore that prescribers for similarity or biological plausibility are using it.

From this study, indications were identified where IVIG seems to play an important role at a clinical level, such as chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, autoimmune hemolytic anemia, polymyositis, systemic lupus erythematosus, and other disorders. However, despite being found as UNIRS uses, it is necessary to carry out an a posteriori literary review to evaluate the efficacy and safety of IVIG for each of these diagnoses.

ACKNOWLEDGMENT

We thank to Universidad Nacional de Colombia and to Hospital Universitario de La Samaritana for providing the necessary information for the development of this project.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors of this document declare that they have no conflict of interests. All the data reported here is for research and academic purposes.

REFERENCES

1. M.M. Olivares, C.E. Olmos, M.I. Álvarez, A.M. Fajardo, A.F. Zea-Vera, M.C. Ortega, C.A. Álvarez, *et al.*, Guía colombiana de práctica clínica para el uso de inmonoglobulinas en el tratamiento de reemplazo e inmunomodulación, *Revista Alergia de México*, **64** (Supl.) s5-s65 (2017).
2. Invima, URL: <https://www.invima.gov.co/>, accessed March 8, 2020.
3. M. Ballow, N. Shehata, A.M. Feldweg, Overview of intravenous immune globulin (IVIG) therapy, available in up to date, (2016).URL: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-intravenous-immune-globulin-ivig-therapy/print#!>, accessed March 5, 2020.
4. Gold Standard Immune Globulin IV, IVIG, IGIV. ASCENIV, BIVIGAM, Carimune, Carimune NF, Flebogamma, Flebogamma DIF, Gamimune N, Gammagard, Gammagard S/D, Gammaked, Gammplex, Gammar-P IV, Gamunex, Gamunex-C, Iveegam, Iveegam EN, Octagam, Panglobulin, Panglobulin NF, panzyga, Polygam S/D, Privigen, Sandoglobulin, Venoglobulin-S, Vigam, available in Medscape/ClinicalKey, accessed March 10, 2020.
5. R. Ramos-Medina, A.L. Corbí, S. Sánchez-Ramón, Inmunoglobulinas intravenosas: Llave inmunomoduladora del sistema inmunológico, *Medicina Clínica*, **139**(3), 112-117 (2012).
6. Bivigam: Immune globulin g intravenous (human), injection, solution, Drugs: Side effects, URL: <https://www.drugs.com/pro/bivigam.html>, accessed March 10, 2020.

7. N. Guzmán-Alvis, J.P. Alzate, S. Celis, M. Carrasquilla, *Análisis de impacto presupuestal del uso de inmunoglobulina humana normal para los pacientes con deficiencia inmune primaria en Colombia*, Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud (IETS), Bogotá, 2016.
8. Invima, Invima informa sobre la situación de abastecimiento de inmunoglobulina G solución inyectable, Noticias 2020, URL: <https://www.invima.gov.co/invima-informa-sobre-la-situacion-de-abastecimiento-de-inmunoglobulina-g-solucion-inyectable>, accessed March 5, 2020.
9. J.E. Machado-Alba, J.C. Moncada-Escobar, Evolución del consumo de medicamentos de alto costo en Colombia, *Revista Panamericana de Salud Pública*, **31**, 283-289 (2012).
10. J.M. Palmezano-Díaz, C.L. Figueroa-Pineda, R.M. Rodríguez-Amaya, L.K. Plazas-Rey, Prevalencia y caracterización de las enfermedades autoinmunitarias en pacientes mayores de 13 años en un hospital de Colombia, *Medicina Interna de México*, **34**(4), 522-535 (2018).
11. G. Pradilla, Diagnóstico y tratamiento de las neuropatías periféricas, 2004, 131-143, URL: <http://www.acnweb.org/guia/g5cap14.pdf>, accessed March 7, 2020.
12. C. Gallastegui, B. Bernárdez, A. Regueira, C. Dávila, B. Leboeiro, Inmunología, In: "Farmacia hospitalaria", Ed. by M.C. Gamundi-Planas, Editorial SEFH, Madrid, 2002, pp. 1077-1106.
13. M.S. Alonso, V.V. García, A.F. Jurado, M.L. Fernández, C.G. García, I.J. Ramos, Directrices de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI: documento de consenso, Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, Madrid, 2011. URL: <https://www.sehh.es/publicaciones/consensos/1743-directrices-de-diagnostico-tratamiento-y-seguimiento-de-la-pti-documento-de-consenso>, accessed March 7, 2020.
14. R. Van Koningsveld, P.I.M. Schmitz, F.G.A. Van der Meche, L.H. Visser, J. Meulstee, P.A. Van Doorn, *et al.*, Effect of methylprednisolone when added to standard treatment with intravenous immunoglobulin for Guillain-Barré syndrome: randomised trial, *The Lancet*, **363**(9404), 192-196 (2004).
15. R.E. Badillo-Tenorio, F.E. Rivas-Larrauri, Lupus eritematoso sistémico y gammaglobulina intravenosa, *Acta Pediátrica de México*, **34**(6), 353-357 (2013).

16. Y.A. Arenas-Rueda, G.L. Pradilla-Arenas, Inmunoglobulina endovenosa como una opción en el manejo de la ictericia neonatal por incompatibilidad ABO, *Médicas UIS*, **28**(1), 91-97 (2015).
17. M.E. Alfonso-Valdés, A. Bencomo-Hernández, Tratamiento de las anemias hemolíticas autoinmunes. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, **29**(4) (2013).
18. L. Servioli, J. Facal, S. Consani, G. Maciel, A. Fernández, Citopenias hematológicas en enfermedades autoinmunes sistémicas, *Archivos de Medicina Interna*, **36**(3), 101-109 (2014).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO:

L.D. Quiroga-Robayo, M.P. Montaña-Ávila, J.J. López-Gutiérrez, Study of the use of IVIG Normal Human Immunoglobulin in the La Samaritana University Hospital during the period of 2017-2019, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(2), 386-405 (2021).

Evaluación del agua minero-medicinal de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia del Chaco, Argentina

Yanina P.D. Erceg, Néstor H. Dudik, Gerardo A. Sáez, Erica M. Soria, Cristian Herman, María B. Nuñez*

Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Carrera Farmacia, Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández N.º 755. (3700) Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

*Autora correspondiente: mbnunez@uncaus.edu.ar

Recibido: 21 de diciembre de 2020

Revisado: 2 de febrero de 2021

Aceptado: 5 de febrero de 2021

RESUMEN

Introducción: el agua minero-medicinal estudiada procede del Complejo Termal de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia del Chaco, ubicado en el nordeste de Argentina. Las aguas de los acuíferos terciarios del norte argentino presentan un marcado gradiente de salinidad desde el sector oeste (subgrupo Jujuy) hasta el sector este (formación Chaco). Los acuíferos son procesos dinámicos y, en consecuencia, la composición del agua subterránea natural debe contemplarse con la perspectiva de su posible variación espacio-temporal. **Objetivos:** analizar y comparar la composición química y la calidad microbiológica del agua de las termas de la ciudad de Sáenz Peña en el período 2016-2018 y evaluar sus principales características fisicoquímicas que definen sus potenciales aplicaciones terapéuticas. **Resultados:** el agua termal por su temperatura se clasifica como agua hipotermal, con pH cercano a la neutralidad, conductividad elevada mostrando su relación directa con la alta salinidad. Por su porcentual equivalente se define como agua clorurada, con alto contenido del anión sulfato y los cationes sodio, potasio, calcio y magnesio. De acuerdo con la composición mayoritaria de cloruros, el uso terapéutico vía tópica sería recomendado para afecciones óseas y musculares, así como problemas dermatológicos y circulatorios.

Palabras clave: Complejo termal, composición fisico-química, análisis microbiológico, acción terapéutica.

SUMMARY

Evaluation of the mineral-medicinal water of Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco province, Argentina

Introduction: The mineral-medicinal water studied comes from the Presidencia Roque Sáenz Peña Thermal Complex, Chaco province, located in the northeast of Argentina. The waters of the tertiary aquifers of northern Argentina present a marked salinity gradient from the western sector (Jujuy subgroup) to the eastern sector (Chaco formation). Aquifers are dynamic processes and consequently, the composition of natural groundwater must be viewed from the perspective of its possible spatial-temporal variation. **Aims:** to analyse and to compare the chemical composition and microbiological quality of thermal water of the city of Sáenz Peña in the 2016-2018 period and to evaluate its main physicochemical characteristics that define its potential therapeutic applications. **Results:** Due to its temperature, the thermal water is classified as hypothermal water, with a pH close to neutrality, high conductivity, showing its direct relationship with high salinity. Its equivalent percentage defined as chlorinated water, with high content of the sulphate anion and the cations sodium, potassium, calcium and magnesium. According to the majority composition of chlorides, topical use is recommended for bone and muscle ailments, as well as dermatological and circulatory problems.

Keywords: Thermal complex, physical-chemical composition, microbiological analysis, therapeutic action.

RESUMO

Avaliação da água mineral-medicinal da Presidência Roque Sáenz Peña, província de Chaco, Argentina

Introdução: a água mineral-medicinal estudada provém do Complexo Térmico Presidencia Roque Sáenz Peña, província de Chaco, localizada no nordeste da Argentina. As águas dos aquíferos terciários do norte da Argentina apresentam um acentuado gradiente de salinidade do setor ocidental (subgrupo Jujuy) ao setor oriental (formação Chaco). Os aquíferos são processos dinâmicos e, conseqüentemente, a composição da água subterrânea natural deve ser vista sob a perspectiva de sua possível variação espaço-temporal. **Objetivos:** analisar e comparar a composição química e qualidade microbiológica das águas termais da cidade de Sáenz Peña

no período 2016-2018 e avaliar suas principais características físico-químicas que definem seus potenciais aplicações terapêuticas. **Resultados:** devido à sua temperatura, a água termal é classificada como água hipotérmica, com pH próximo da neutralidade, alta condutividade, mostrando sua relação direta com a alta salinidade. Seu percentual equivalente definido como água clorada, com alto teor do ânion sulfato e dos cátions sódio, potássio, cálcio e magnésio. De acordo com a composição majoritária dos cloretos, o uso tópico é recomendado para doenças ósseas e musculares, bem como para problemas dermatológicos e circulatórios.

Palavras-chave: Complexo térmico, composição físico-química, análise microbiológica, ação terapêutica.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define al agua termal como: “agua bacteriológicamente incontaminada que procedente de una fuente subterránea natural o perforada, contiene una determinada mineralización y puede inducir efectos favorables para la salud, debiendo estar así reconocido por la autoridad pertinente del país de origen” [1].

La fuente termal de este estudio se localiza en la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña, en la provincia del Chaco, Argentina. El complejo termal fue reinaugurado a finales del 2002 y sus instalaciones tienen fines turísticos y terapéuticos [2].

El clima que caracteriza a la ciudad de Sáenz Peña es propio de la árida llanura Chaco-Pampeana. Boujon *et al.* [3] describieron esta región hidrometeorológica indicando que el sector central de las provincias de Formosa y Chaco (donde se localiza la ciudad de Sáenz Peña) presenta un clima seco-subhúmedo. Las máximas precipitaciones se registran principalmente en primavera-verano y oscilan entre 500 y 800 milímetros. La evapotranspiración real es elevada (700-1000 milímetros). La temperatura media anual es 21 y 22 ° C. También puede señalarse que esta zona presenta valores mínimos puntuales de -5 ° C (invierno) y máximos de más de 40 ° C (verano).

El territorio de la región chacoparanaense (NE argentino) se encuentra en un sistema no volcánico, que es una cuenca sedimentaria terciaria [4]. Las aguas de los acuíferos terciarios del norte argentino presentan marcado gradiente de salinidad desde el sector oeste (depósitos del Mioceno Superior-Plioceno en el subgrupo Jujuy, formación India Muerta y Las Cañas) hasta el sector este (depósitos del Mioceno Superior-Plioceno en la formación Chaco). En los sectores pedemontanos del oeste presentan valores de conductividad eléctrica inferiores a los 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En la zona de llanura se incrementa

la salinidad, con una conductividad eléctrica entre 1000 y 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (facies salina sulfatada sódica). Hacia el oeste de Santiago del Estero y centro de Chaco, la conductividad aumenta a más de 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (facies salina clorurada sódica) [1].

El agua subterránea natural puede presentar variaciones debido a factores como la naturaleza geológica, la disposición espacial, solubilidad de los materiales en contacto con el agua, la superficie y tiempo del contacto, temperatura del acuífero, presión, existencia de gases, grado de saturación del agua en relación con las distintas sustancias incorporadas, etc. [5-7]. La composición media del agua subterránea suele considerarse invariable en un acuífero, pero no debe olvidarse las interacciones agua-medio, que determinan si son procesos dinámicos desarrollándose a ritmo diverso [8]. Por tanto, la composición química queda definida de modo apropiado si se describe en un lugar y momento determinado.

Los objetivos del trabajo fueron analizar y comparar la composición química y calidad microbiológica del agua de las termas de la ciudad de Sáenz Peña en el período 2016-2018 y definir sus principales características fisicoquímicas que definen sus potenciales aplicaciones terapéuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

Se realizó siguiendo las recomendaciones del apartado 1060 [9] para la recolección, conservación y preservación de la muestra. La recolección de muestras se realizó en tres tiempos al año. El agua se extrajo en la fuente de bombeo de una perforación a 100 metros de profundidad, tomando cada muestra después de 30 minutos de flujo del agua.

En el lugar de muestreo se realizaron los análisis preliminares tomando la muestra en un frasco de vidrio boca ancha de 500 ml. Las muestras de agua para el análisis químico se colectaron en botellas plásticas blancas de alta densidad con tapa rosca de 500 ml, adicionando un preservante para algunos ensayos (dureza, oxígeno disuelto). Para el análisis microbiológico se usaron frascos plásticos estériles de 250 ml. Las muestras se conservaron en refrigeración desde la recolección del agua y hasta su uso en el laboratorio.

Determinación de las características fisicoquímicas del agua termal

Los ensayos preliminares se realizaron en el lugar de muestreo utilizando el equipo Hanna Hi 9828 para el control de temperatura del agua, pH, conductividad, mbar, ORP y salinidad.

En el laboratorio se siguieron las técnicas recomendadas en la literatura [9] y se cuantificó por volumetría la dureza total (método titulométrico) y alcalinidad total (método titulométrico con anaranjado de metilo). Los residuos sólidos totales se determinaron por el método gravimétrico por secado en estufa convencional (a 105 °C), los residuos sólidos fijos y residuos sólidos volátiles por ignición (500 °C).

Estudio de la composición química del agua termal

La evaluación se realizó por métodos convencionales, determinando el contenido de cloruro (método argentométrico), anión bicarbonato (método titulométrico), anión carbonato (método titulométrico con fenolftaleína), dióxido de carbono (método titulométrico con fenolftaleína, pH 8,3) y catión calcio (método titulométrico EDTA). Otras determinaciones realizadas fueron el contenido de sulfato (método gravimétrico), anión nitrato (espectrofotometría UV-visible, a 220 nm y 275 nm), fluoruro e hierro (colorimetría), contenido de sodio y potasio (fotometría de emisión de llama), y catión magnesio (por cálculo).

Evaluación microbiológica del agua termal

Las muestras fueron recolectadas en la fuente de agua y envasadas en recipientes estériles, luego trasladadas bajo refrigeración al laboratorio de microbiología.

Determinación de aerobios viables. Se inoculó en profundidad 1 ml de la muestra sin diluir en placas con Plate Count Agar (PCA) y se incubó por 24 a 48 h a 37 °C. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Determinación de coliformes totales y fecales. Para la determinación de coliformes totales se utilizó el método de recuento por dilución en tubo y se hizo la determinación del número más probable. Se inocularon 10, 1,0 y 0,1 ml de muestra en tres tubos por cada dilución en caldo MacConkey con campana de Durham para determinar la producción de gas. El caldo MacConkey fue preparado a doble concentración. Los tubos fueron incubados por 24 a 48 h a 37 °C. La presencia de turbidez y producción de gas será indicativo de presencia de bacterias coliformes. Los resultados se determinaron utilizando la tabla de Hoskins. Para coliformes fecales, de los tubos con caldo MacConkey que dieron crecimiento positivo en el ensayo de coliformes totales, se tomaron muestras con anza y se inocularon en 10 ml de caldo Brila (con campana de Durham) y en 10 ml de caldo peptonado y se incubaron a 44,5 °C por 48 h. La presencia de turbidez en ambos medios, con la formación de gas en caldo Brila, confirma la presencia de coliformes fecales.

Determinación de Escherichia coli. Para determinar la presencia de la bacteria en la muestra se utilizaron los tubos con caldo Brila que dieron positivo en el ensayo de

determinación de coliformes fecales. A partir de estos tubos se tomaron 50 μ l y se inocularon en caldo EC y se incubaron a 44 °C durante 24 h. La presencia de turbidez será confirmativa de la presencia de *E. coli* en la muestra.

Determinación de *Staphylococcus aureus*. Para determinar la presencia de esta bacteria se realizó una siembra en superficie de 0,1 ml de muestra en placas conteniendo agar Baird-Parker. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h. Colonias brillantes de color de gris oscuro a negro y halos transparentes alrededor de las colonias son indicativos de la presencia de *S. aureus*.

Determinación de hongos y levaduras. La presencia de hongos y levaduras se determinó sembrando en profundidad 1 ml de muestra en Sabouraud dextrosa e incubando a 25 °C durante 72 h.

Determinación de enterobacterias. Se inoculó en profundidad un 1 ml de la muestra sin diluir en placas con violeta rojo bilis glucosa (VRBG) y se incubó por 24 h a 37 °C. Todos los ensayos microbiológicos se realizaron por duplicado.

Clasificación del agua mineromedicinal y descripción de su potencial uso

De acuerdo con los valores obtenidos en los análisis químicos se confirmará la clasificación del tipo de agua termal disponible en este complejo termal. Según la composición química se definirá los usos medicinales recomendados en la bibliografía relacionada a la temática.

Análisis estadístico

En cada análisis se evaluaron los valores usando planilla Microsoft® Excel para definir valores promedio y desviación estándar. El programa de estadística Statgraphics XVII (versión gratuita en español) se usó para el análisis multivariante, utilizando Anova, pruebas de rangos múltiples y pruebas de Kruskal-Wallis. Esto permitió determinar diferencias significativas en la composición química entre cada medición mensual de los tres años evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química del agua termal

El agua obtenida en el punto de extracción se observó con una turbiedad de color pardo dado al material en suspensión inicial. Luego de 24 a 48 h se decantó un fino sedimento y el agua parecía transparente. El sabor fue salobre y con un olor que recuerda al salitre.

Tabla 1. Características físico-químicas del agua termal de Sáenz Peña (Argentina).

Parámetros	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Temperatura (°C)	26,55 ± 0,05*	26,60 ± 0,10*	26,78 ± 0,03	27,50 ± 0,10*	27,61 ± 0,10*	27,00 ± 0,10*	27,00 ± 0,1	27,43 ± 0,06	26,37 ± 0,25*
pH	6,98 ± 0,08*	6,95 ± 0,05	7,04 ± 0,03*	6,85 ± 0,05	7,39 ± 0,01*	7,10 ± 0,10	5,82 ± 0,01*	6,47 ± 0,06*	6,73 ± 0,01*
Conductividad (µS/cm)	44 928,33 ± 7,64	44 571,7 ± 2,89	47 048,33 ± 2,89	45 520 ± 10*	44 671,67 ± 18,93*	44 405 ± 5	44 405 ± 5*	44 525 ± 5*	38 148 ± 2,89
mbar	1015,60 ± 0,1*	1008,17 ± 0,06	1001,20 ± 0,10*	1014,70 ± 0,20	1004,20 ± 0,10*	1007,30 ± 0,10*	1012,33 ± 0,58*	1011,23 ± 0,06*	1003,17 ± 0,15
ORP	-175,12 ± 0,08*	-119,80 ± 0,10	-74,40 ± 0,10*	-14,38 ± 0,08	-47,70 ± 0,10	-48,45 ± 0,05	169,20 ± 0,1*	-75,20 ± 0,10	40,13 ± 0,06*
Salinidad (ppt)	28,50 ± 0,10	28,13 ± 0,03	29,41 ± 0,04*	28,45 ± 0,05	27,29 ± 0,04*	28,62 ± 0,02	28,23 ± 0,03	28,75 ± 0,05*	25,41 ± 0,12*

Referencias: los valores son expresados como media ± desviación estándar, n = 3 por grupo experimental. *: Indica diferencia significativa (p<0,05) para el parámetro entre muestras en el mismo mes del período 2016 - 2018: marzo (M1, M4 y M7), agosto (M2, M5 y M8) y octubre (M3, M6 y M9). No hubo diferencias significativas en las demás comparaciones.

El agua termal surgió en el momento del bombeo a temperatura entre 26,5 y 27,6 °C, por lo que se clasificó como agua hipotermal (< 35 °C). El pH del agua termal presentó valores cercanos a la neutralidad (pH entre 5,8 y 7,4), valores compatibles con lo tolerado por la piel (pH de la piel 5,5). La conductividad presentó valores elevados (tabla 1), esto mostró su relación directa con la salinidad. Estos datos coinciden con lo reportado por Boujon *et al.* [3], que indicaron que en el oeste de Santiago del Estero y centro de Chaco la conductividad aumenta a más de 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mostrando facies salina clorurada sódica que coincide con lo presentado en la tabla 4.

El potencial redox (ORP) mide la energía química de oxidación-reducción en el sistema, en este caso predominan valores negativos indicando procesos de reducción, aunque algunas mediciones positivas indicaron procesos de oxidación en distintos períodos en los tres años observados.

Las principales diferencias estadísticas ($p < 0,05$) estuvieron en las muestras de marzo de 2016 y 2018 en lo que respecta a pH, mBar y ORP, posiblemente porque el 2016 fue más lluvioso en comparación al 2018 [10-13]. En las muestras de agosto se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre 2017 y 2018 para los valores de pH, conductividad, mBar y salinidad, donde se observó mayor cantidad de precipitación en 2018 [10-13]. En las muestras de noviembre se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre 2016 y 2018 respecto de la conductividad, ORP y salinidad. Nuevamente se observó que los últimos meses del 2016 fueron más lluvioso en comparación con 2018 [10-13].

Los valores de alcalinidad se determinaron por titulación con fenolftaleína y no presentó cambio de color, lo cual indicó ausencia de iones carbonato e hidroxilos. La titulación con anaranjado de metilo presentó un color amarillo brillante, lo que significa presencia de iones bicarbonato en las muestras. Esto puede relacionarse con la dinámica del “equilibrio carbónico”, donde la presencia de CO_2 libre (ver en tabla 3) y valores de pH entre 6 a 8,5 justificaría el predominio de iones bicarbonatos en las muestras de agua en estudio [14]. Los valores más altos de dureza en comparación con la alcalinidad total indicarían que tenemos otros aniones que aportan calcio en la muestra.

La mineralización global del agua puede definirse según el residuo seco a 110 °C y clasificarlas en aguas oligometálicas cuando el residuo seco es inferior a 100 mg/l; de mineralización muy débil: con residuo seco comprendido entre 100 y 250 mg/l; mineralización débil: con residuo seco entre 250 y 500 mg/l; mineralización media: con residuo seco entre 500 y 1000 mg/l y mineralización fuerte: con residuo seco superior a 1000 mg/l [15]. En el caso del agua termal del Complejo de las Termas de Sáenz Peña se puede definir como aguas de mineralización fuerte.

Tabla 2. Alcalinidad, dureza y sólidos del agua termal de Sáenz Peña (Argentina).

Parámetros	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Alcalinidad (mg/l)	672 ± 28*	606,67 ± 16,17	616,01 ± 7,00	609 ± 7,01	569,33 ± 8,08	620,66 ± 16,17	591,67 ± 7,64*	596,67 ± 11,55	599,66 ± 14,572
Dureza Total (mg/l)	4992,5 ± 49,92*	5059,07 ± 11,53*	5004,55 ± 22,54	4779,51 ± 64,19	4812,80 ± 79,88	4992,53 ± 19,97	3808,08 ± 85,75*	3916,11 ± 9,36*	3969,80 ± 29,82
Sólidos torales (g/l)	20,06 ± 0,03*	19,49 ± 0,74*	40,59 ± 0,116	35,52 ± 0,23*	51,52 ± 3,45*	38,94 ± 1,68	37,86 ± 0,65*	43,2 ± 2,16*	40,59 ± 0,156
Sólidos fijos (g/l)	18,31 ± 0,05*	17,97 ± 0,61*	37,19 ± 0,15	32,52 ± 0,13*	49,43 ± 3,34*	35,47 ± 1,49	34,97 ± 0,65*	38,45 ± 0,33*	40,59 ± 0,156
Sólidos volátiles (g/l)	1,73 ± 0,02	1,33 ± 0,18	3,41 ± 0,09	3,01 ± 0,12	2,09 ± 0,28	3,46 ± 0,19	3,02 ± 0,08	3,68 ± 0,33	3,41 ± 0,098
Sólidos disueltos ^a (mg/l)	22 917,6	23 080,5	23 084,4	19 572,6	18 705,9	18 636,9	22 517,3	22 517,3	22 495,1

Referencias: los valores son expresados como media ± desviación estándar, n = 3 por grupo experimental.

*: Indica diferencia significativa (p<0,05) para el parámetro entre muestras en el mismo mes del período 2016 - 2018: marzo (M1, M4 y M7), agosto (M2, M5 y M8) y octubre (M3, M6 y M9). No hubo diferencias significativas en las demás comparaciones. (±) Sumatoria de los valores de aniones y cationes determinados en cada muestra del estudio.

Respecto a las diferencias significativas, los valores de alcalinidad solamente fueron diferentes en la primera medición anual entre 2016 y 2018. Los valores más altos de alcalinidad se observaron en 2016. De igual modo se encontró diferencia significativa entre los valores de dureza de la primera y segunda medición anual de 2016 y 2018. Para este parámetro se observaron los valores más altos en 2016. Los meses de la primera y segunda medición en 2016 presentaron mayor cantidad de lluvias que en 2018 [10-13].

En lo que se refiere a residuos sólidos, se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la primera y segunda medida anual de residuos totales y residuos fijos en 2016 respecto de los valores del 2017 y 2018. En este caso, los valores resultaron relativamente más bajos en 2016. Los sólidos disueltos totales (SDT) incluyen principalmente a los componentes aniónicos y catiónicos de sales inorgánicas disueltos en el agua. En este caso se observó el contenido SDT más bajo que en 2017, lo que coincide con el periodo de menor cantidad de lluvia anual del trienio analizado.

Composición química del agua termal

Cuando las aguas tengan una alta mineralización global, con 1 g/l o más, la clasificación de las aguas se hará según el contenido iónico mayoritario, y se considerarán como cloruradas, sulfatadas, bicarbonatadas, sódicas, cálcicas o magnésicas. Cuando la mineralización no supere el gramo de residuo se indicarán solo como iones predominantes [15].

De acuerdo con los valores obtenidos en la tabla 3 para el período 2016-2018, el agua termal presentó dos componentes aniónicos mayoritarios (>1 g/l), a saber, cloruros y sulfatos. También se encontró un alto contenido de sodio en su composición catiónica (>1 g/l), acompañado de magnesio, potasio, calcio, pero con valores menores a 1 g/l.

La concentración de calcio alrededor de 600 mg/l (tabla 3) indicaría presencia de terrenos yesíferos en las napas subterráneas que recorren las aguas mineromedicinales [16]. Los valores altos de magnesio (tabla 3) indicarían la posible presencia de terrenos evaporíticos, ya que alcanza valores cercanos a 1000 mg/l [16].

Entre los elementos traza se encontraron a los iones hierro (en un rango de 0,66 a 2,24 mg/l), fluoruro (0,54 a 1,45 mg/l) y nitrato (0,56 a 0,99 mg/l), así como gas dióxido de carbono (145,2 a 243,5 mg/l).

Las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) más notorias estuvieron entre las muestras de los iones calcio, sodio, potasio, hierro, fluoruro, nitrato y gas dióxido de carbono (tabla 3). En cambio los iones cloruro, bicarbonatos y sulfato presentaron variaciones menos frecuentes en este período de tiempo estudiado. Respecto de los iones fluoruro, calcio, hierro y gas dióxido de carbono hubo diferencias en la primera medición (marzo) de

Tabla 3. Composición química del agua termal de Sáenz Peña (Argentina).

Aniones	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Cloruro (mg/l)	13 187,41 ± 85,1	13 258,30 ± 419,7	13 059,78 ± 85,1	9 737,41 ± 59,6*	8 844,07 ± 29,8	9 171,62 ± 59,6	13 612,80 ± 112,5*	13 201,58 ± 88,5	13 031,42 ± 64,9
Sulfato (mg/l)	4 752,26 ± 9,58	4 777,81 ± 14,63*	4 800,17 ± 9,58*	4 860,84 ± 213,45	4 985,40 ± 94,52	4 685,19 ± 9,58	4 442,47 ± 29,27	4 471,21 ± 19,94*	4 608,54 ± 9,58*
Bicarbonato (mg/l)	6 77,68 ± 17,26	7 32,49 ± 14,95	7 27,51 ± 22,83	6 82,67 ± 17,26	6 97,62 ± 17,26*	8 37,14 ± 29,90	6 42,80 ± 14,95	5 92,56 ± 7,92*	6 57,75 ± 29,89
Fluoruro (mg/l)	1,37 ± 0,025	0,784 ± 0,005*	1,45 ± 0,005*	1,17 ± 0,025	0,66 ± 0,02	1,20 ± 0,015*	1,06 ± 0,025*	0,54 ± 0,015*	1,41 ± 0,021
Nitrato (mg/l)	0,81 ± 0,002	0,73 ± 0,013*	0,78 ± 0,007*	0,56 ± 0,003*	0,99 ± 0,007*	0,99 ± 0,007*	0,91 ± 0,005*	0,98 ± 0,004	0,907 ± 0,002
Dióxido de carbono (mg/l)	145,2 ± 8,80*	229,53 ± 3,36	231,00 ± 6,60*	243,47 ± 5,08	178,64 ± 0,44	202,4 ± 13,20	180,40 ± 4,41*	165,01 ± 13,74	170,13 ± 9,16*
Cationes									
Potasio (mg/l)	595,45 ± 0,51*	621,66 ± 0,58*	731,33 ± 1,53*	648,16 ± 1,61*	626,66 ± 0,76	571,66 ± 7,67*	614,96 ± 0,25	635,1 ± 0,36*	687,5 ± 0,71
Sodio (mg/l)	1 125,73 ± 0,25*	1 102,16 ± 0,76*	1 216 ± 2,65	1 238,17 ± 1,04*	1 168,5 ± 0,10	1 032,3 ± 2,52*	1 154,07 ± 0,40	1 186,17 ± 0,29*	1 228,5 ± 0,50*
Calcio (mg/l)	607,08 ± 7,98*	616,41 ± 8,31*	583,12 ± 15,97*	594,82 ± 2,25	567,48 ± 4,51	509,90 ± 3,74*	475,33 ± 13,49*	477,49 ± 9,90*	561,82 ± 4,61
Magnesio (mg/l)	970,52 ± 9,34	991,99 ± 7,79*	976,65 ± 8,69	953,87 ± 18,09	962,47 ± 22,83	1 016,89 ± 7,38*	717,82 ± 22,89	618,88 ± 12,81*	723,73 ± 11,57*
Hierro (II) (mg/l)	0,66 ± 0,01*	1,31 ± 0,01*	2,21 ± 0,01	0,86 ± 0,01	1,75 ± 0,08*	2,24 ± 0,006*	0,95 ± 0,01*	1,42 ± 0,01	2,01 ± 0,04*

Referencias: los valores son expresados como media ± desviación estándar, N = 3 por grupo experimental. *: Indica diferencia significativa (p<0,05) para el parámetro entre muestras en el mismo mes del período 2016 - 2018: marzo (M1, M4 y M7), agosto (M2, M5 y M8) y octubre (M3, M6 y M9). No hubo diferencias significativas en las demás comparaciones.

2016 y 2018; coincidiendo con la finalización de la época estival de mayor cantidad de lluvias, 2018 resultó más lluvioso en este período estudiado [10-13].

También se observaron variaciones del contenido de sodio, potasio, calcio, magnesio, sulfato y fluoruro en la segunda medición (agosto) de 2016 y 2018, coincidiendo con la época invernal que es un período de menor cantidad de lluvias en el año. Los iones fluoruro, nitrato, potasio y calcio mostraron diferencias significativas en la tercera medición (noviembre) de 2016 y 2017, mientras que los iones hierro y magnesio mostraron diferencia en esta medición entre 2017 y 2018. Este mes coincide con el inicio del período de lluvias al comenzar la época del verano, donde la cantidad de lluvias fue menor en 2017.

En la tabla 4 se presentan los valores porcentuales respecto de los miliequivalentes por litro del promedio de los valores de 2018. Ahí se observa que predominan los iones cloruro (85,9%) y sodio (47,3%). Similar predominio de estos iones se observó en 2016 y 2017 (datos no presentados en el trabajo).

Tabla 4. Componentes iónicos y equivalente porcentual del agua termal de Sáenz Peña.

Iones presentes	mg/l*	meq/l	% meq
Cloruros	13 281,93	374,67	85,94
Sulfatos	4507,40	46,95	10,77
Bicarbonatos	631,04	10,34	2,37
Dióxido de carbono	171,85	3,91	0,90
Fluoruro	1,03	0,05	0,01
Nitratos	0,95	0,02	0,00
Suma aniones	18 594,20	435,94	100,00
Sodio	1189,58	51,72	47,34
Potasio	645,85	16,56	15,16
Calcio	504,87	12,62	11,55
Magnesio	686,81	28,26	25,87
Hierro	4,38	0,08	0,07
Suma cationes	3031,49	109,25	100,00

Referencia: (mg/l*) valor promedio de las 3 mediciones realizadas en 2018.

Evaluación microbiológica del agua termal

El recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en este período de tiempo estuvo en el rango de menos de 10 y hasta 70 UFC/ml. Estas variaciones fueron más notorias

cuando se realizaba menor bombeo de agua y aumentaba el recuento de bacterias. De igual modo, esta concentración está dentro del rango aceptado por las directrices de calidad turística para termas de Argentina [17], el límite es hasta 100 UFC/ml para aguas termales usadas en balneoterapia.

En las muestras del agua termal se determinó ausencia de enterobacterias, coliformes totales y coliformes fecales, salvo en dos muestreos que dio positivo para coliformes totales presentando valores de 23 y 95 UFC/ml y dio positivo para *Escherichia coli*. La presencia de coliformes totales no siempre resulta indicativo de una contaminación, debido a que este tipo de microorganismos están presentes en el suelo [18] y desde ahí pueden pasar al flujo de agua por infiltración en el terreno. En cambio, la presencia de coliformes fecales y de *E. coli* representa contaminación, la que podría provenir de las napas freáticas contaminadas o a través de las cañerías que presentan fugas [18]. Esta situación se revirtió en las siguientes determinaciones, hubo ausencia en los resultados obtenidos.

Para las determinaciones de hongos y levaduras no hubo crecimiento microbiano en todas las muestras. La presencia de hongos y levaduras es poco frecuente en aguas minerales, aunque pueden encontrarse en sitios como las piletas donde frecuentan los bañistas [19].

También se determinó ausencia de *Staphylococcus aureus*. Este tipo de bacteria se encuentra en el ambiente y llegan a los manantiales o cuerpos de agua a través del aire, el suelo y la lluvia, el hombre es su reservorio [19], por lo que es menos frecuente en aguas subterráneas.

Clasificación y potencial uso terapéutico del agua termal

Las aguas mineromedicinales se clasifican según los iones predominantes en la composición química y se definen con el nombre de los iones mayoritarios si las aguas contienen más de 1 g/l de esos componentes [15].

En el caso de las termas del complejo de la ciudad de Sáenz Peña, Chaco, Argentina, podemos decir que las aguas son clorosulfatadas. El anión cloruro y sulfato se encuentran con una concentración de más de 1 g/l y están acompañados de los cationes sodio, potasio, calcio y magnesio (entre los componentes mayoritarios), lo cual condice con la descripción conocida de este agua termal. El alto contenido de cloruro y de sodio refleja un origen profundo y la presencia de mares pretéritos [20], y se considera según su concentración como fuerte (si contiene más de 50 g/l), mediana (entre 10 y 50 g/l) y débil (menos de 10 g/l). En este caso sería un agua clorurada de concentración mediana.

Las aguas cloruradas por vía tópica son consideradas estimulantes sobre las funciones orgánicas y metabólicas, mejoradoras del trofismo celular y de los procesos de cicatrización y reparación tisular, y favorecedoras de la circulación sanguínea y linfática [21]. Estas recomendaciones coinciden con las recomendaciones actuales de uso: para dolencias

óseas, dermatológicas, musculares y circulatorias [22, 23]. Estas indicaciones son compatibles con la modalidad de uso en el complejo termal, donde el paciente dispone de baños privados para la inmersión durante un tiempo estipulado, la pileta general con chorros de agua y el uso para aplicación en tratamientos cosméticos faciales y corporales [24]. Las recomendaciones por la presencia de iones sulfato son para la vía oral, sin embargo, en este caso no es oportuno por el sabor muy salobre y su fuerte mineralización.

CONCLUSIONES

El agua termal de la ciudad de Sáenz Peña, Chaco, Argentina, por su temperatura puede clasificarse como agua hipotermal, pH cercano a la neutralidad, por lo que es compatible con la piel. La conductividad presentó valores elevados mostrando su relación directa con la alta salinidad. El agua termal por su porcentual equivalente se define como agua clorosulfatada, acompañada por los cationes sodio, potasio, calcio y magnesio. Las diferencias estadísticas más frecuentes fueron las de los iones calcio, sodio, potasio, hierro, fluoruro, nitrato y gas dióxido de carbono; esto podría estar en relación con las variaciones en cantidad de lluvias ocurridas durante los tres años observados. De acuerdo con la composición mayoritaria de cloruros, el uso terapéutico vía tópica sería recomendado para afecciones óseas y musculares, así como problemas dermatológicos y circulatorios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a la Secretaría de Investigación, Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Chaco Austral y al Sistema de Becas EVC-CIN de Argentina.

CONFLICTO DE INTERESES

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

REFERENCIAS

1. P.L. Branco-Bonfada, M.R.H. Bonfada, M.E.A. González, J.M. Gonçalves-Gândara, El turismo de salud y el uso terapéutico del agua, *Estudios y Perspectivas en Turismo*, **20**(2), 462-477 (2011).

2. J.A. Alberto, *Aguas termales y minerales*, Diario Norte (2019), URL: <https://www.diarionorte.com/185214-aguas-termales-y-minerales>, consultado en julio de 2020.
3. P. Boujon, D.S. Fernández, D.S. Trevisiol, F.X. Pereyra, L. Gambandé, *Hidrogeología de la región chaqueña de la República Argentina*, IX Congreso Argentino de Hidrogeología y VII Seminario Hispano-Latinoamericano sobre temas actuales de la Hidrología Subterránea, Catamarca, Argentina, 2016.
4. A.H. Pesce, La geotermia y su importancia en el desarrollo económico, Departamento de Geotermia (Segemar), Argentina, comunicación personal, 2012.
5. I. Delgado-Outeirino, P. Araujo-Nespereira, J.A. Cid-Fernandez, J.C. Mejuto, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gandara, Hydrogeothermal modelling vs. inorganic chemical composition of thermal waters from the area of Carballino (NW Spain). *Hydrology and Earth System Sciences*, **16**, 157-166 (2012).
6. D.L. López, J. Bundschuh, G.J. Soto, J.F. Fernández, G.E. Alvarado, Chemical evolution of thermal springs at Arenal Volcano, Costa Rica: Effect of volcanic activity, precipitation, seismic activity, and Earth tides, *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **157**, 166-181 (2006).
7. J. Olivier, J.S. Venter, C.Z. Jonker, Thermal and chemical characteristics of hot water springs in the northern part of the Limpopo Province, South Africa, *Water SA*, **37**(4), 427-436 (2011).
8. Instituto Geológico y Minero de España, Capítulo 1. La composición química de las aguas subterráneas naturales, pp. 16-33, URL: https://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/pdf/lib43/1_1.pdf
9. American Public Health Association, American Water Works Association, *Water Environment Federation, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd Ed., Washington, 2017.
10. APA (Administración Provincial de Agua), *Precipitaciones. Año hidrológico 2015-2016*, URL: <http://apachaco.gob.ar/site/images/prec15-16.pdf>, consultado en septiembre de 2020.
11. APA (Administración Provincial de Agua), *Precipitaciones. Año hidrológico 2016-2017*, URL: <http://apachaco.gob.ar/site/images/prec16-17.pdf>, consultado en septiembre de 2020.

12. APA (Administración Provincial de Agua), *Precipitaciones. Año hidrológico 2017-2018*, URL: <http://apachaco.gob.ar/site/images/precipitaciones/PREC%2017-18.pdf>, consulta setiembre 2020.
13. APA (Administración Provincial de Agua), *Precipitaciones. Año hidrológico 2018-2019*, URL: <http://apachaco.gob.ar/site/images/prec18-19.pdf>, consultado en septiembre de 2020.
14. E.A. Bustamante-Ibáñez, *Identificación de procesos hidrogeoquímicos aplicando modelación inversa en el acuífero Soconusco, Chiapas*, Tesis de Maestría en Geociencias Aplicadas, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, México, 2017.
15. F. Armijo, D. De Michele, M. Giacomino, *et al.*, Análisis de las aguas minerales de la provincia de Entre Ríos, Argentina, *Balnea*, **61**(4), 55-84 (2008).
16. E.E. Mariño, R.F. García, *Apuntes sobre aplicaciones ambientales de la hidrogeoquímica*, *Secretaría de Infraestructura y Política Hídrica*, Universidad Nacional de La Pampa, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, 2018, URL: <https://www.cohife.org/advf/documentos/2019/09/5d6eebe415ac8.pdf>, consultado en abril de 2020.
17. Secretaría de Turismo de la Nación, *Directrices de calidad turística para termas. Manual de Aplicación*, pp. 24-25. Argentina, (s.f.), URL: <https://eco.mdp.edu.ar/cendocu/repositorio/00582.pdf>, consultado en diciembre de 2020.
18. S.V. Núñez-Almeida, *Estudio microbiológico de las aguas termomineromedicinales del Balneario "El Salado" de baños de Agua Santa-Tungurahua*, Trabajo de Titulación, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, 2015, 129 p.
19. J.A. Larrea-Murrell, M.M. Rojas-Badia, B. Romeu-Álvarez, N.M. Rojas-Hernández, M. Heydrich-Pérez, Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura, *Revista Cenic, (Ciencias Biológicas)*, **44**(3), 24-34 (2013), URL: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>, consultado en octubre de 2020.
20. J.R. Fagundo, A. Cima, P. González, *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales*, Centro Nacional de Termalismo "Victor Santamarina", 27 p., URL: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/clasificacion_aguas_minerales.pdf, consultado en septiembre de 2018.

21. F. Armijo, J. Ejeda, J. Maraver, *et al.*, *Vademécum de las aguas mineromedicinales de Galicia*, Universidad de Santiago de Compostela, Vía Láctea Comunicación, S.L., España, 2017.
22. R. Sánchez, Complejo termal de Sáenz Peña, Chaco, *Argentina Termal*, 2018, URL: <https://argentinatermal.com.ar/?p=2325>, consultado en diciembre de 2020.
23. J.C. San José-Rodríguez, Aguas mineromedicinales argentinas, *Balnea*, **4**, 13-34 (2008).
24. Argentina Turismo, Termas y Spa de Roque Sáenz Peña, *Portal Turístico Nacional* (s.f.), URL: <https://www.argentinaturismo.com.ar/roquesaenzpena/termas.php>, consultado en diciembre de 2019.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Y.P.D. Erceg, N.H. Dudik, G.A. Sáez, E.M. Soria, C. Herman, M.B. Nuñez, Evaluación del agua minero-medicinal de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia del Chaco, Argentina, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(2), 406-422 (2021).

Análisis del desecho de medicamentos en Costa Rica durante el 2019, un paso hacia la ecofarmacovigilancia

María José Muñoz-Bejarano^{1a*}, Yoselyn Ruiz Rodríguez^{1b}, Gustavo Sáenz-García^{2c}, Ramsés Alfaro-Mora^{1d}

¹ Universidad Latina de Costa Rica, Escuela de Farmacia, San José, Costa Rica.

² Dirección Ejecutiva de la Empresa de Recolección de Medicamentos en Desuso, San José, Costa Rica.

*Autor para correspondencia: mariamunozbejarano@gmail.com

^a <https://orcid.org/0000-0002-9141-2881>

^b <https://orcid.org/0000-0001-5756-9298>

^c <https://orcid.org/0000-0001-5838-6629>

^d <https://orcid.org/0000-0002-7331-9405>

Recibido: 21 de enero de 2021

Revisado: 3 de enero de 2021

Aceptado: 5 de febrero de 2021

RESUMEN

Introducción: según la Organización Mundial de la Salud, el desecho de medicamentos es la eliminación de todos aquellos productos farmacéuticos que han expirado, derramado o contaminado y medicamentos que no son de utilidad y necesitan disponerse de forma adecuada. **Objetivo:** caracterizar los medicamentos desechados en Costa Rica durante el 2019, con el sistema de recolección de una empresa de recolección de medicamentos en desuso. **Materiales y métodos:** se realizó un estudio observacional, descriptivo-analítico y de corte transversal. El estudio se desarrolló en las instalaciones de la empresa MPD en Curridabat, San José, donde se almacenan los contenedores de la empresa. Los datos obtenidos se depositaron en una base de datos elaborada en Excel 2016. **Resultados:** en su mayoría los medicamentos encontrados vencidos eran de uso humano, especialmente para adultos, la forma farmacéutica más común fue la enteral, procedentes de los sectores privado y público. Existe una relación significativa entre la condición de los medicamentos y su origen, así como entre el origen y la forma farmacéutica. No existe relación significativa entre la forma farmacéutica de los medicamentos y la condición de estos, tampoco entre la nacionalidad y la condición. **Conclusiones:** la condición de desuso fue la que más prevaleció dentro de los medicamentos desechados. El principio activo más desechado fue el paracetamol y el principal grupo farmacológico encontrado en los productos desechados fue el de los analgésicos.

Palabras claves: disposición final, utilización de medicamentos, residuos, reciclaje, almacenaje de medicamentos.

SUMMARY

Analysis of drug waste in Costa Rica during 2019, a step towards Ecopharmacovigilance

Introduction: according to the World Health Organization, the disposal of medicines is the elimination of all those pharmaceutical products that have expired, spilled, or contaminated and medicines that are not useful and need to be disposed of properly. **Objective:** to characterize the medicines discarded in Costa Rica during 2019, with the collection system of a company that collects disused medicines. **Materials and methods:** an observational, descriptive-analytical, and cross-sectional study was carried out. The study was carried out at the facilities of the MPD Company in Curridabat, San José, where the company's containers are stored. The data obtained was deposited in a database elaborated in Excel 2016. **Results:** most of the expired drugs were for human use, especially for adults, the most common pharmaceutical form was enteral, from the private and national sectors. There is a significant relationship between the condition of the drugs and their origin, as well as between the origin and the pharmaceutical form. There is no significant relationship between the pharmaceutical form of the drugs and their condition, nor between nationality and condition. **Conclusions:** the condition of disuse was the most prevalent among the discarded drugs. The most discarded active principle was paracetamol and the main pharmacological group found in discarded products was analgesics.

Keywords: final disposal, drug use, waste, recycling, drug storage.

RESUMO

Análise de resíduos de drogas na Costa Rica em 2019, um passo em direção à ecofarmacovigilância

Introdução: de acordo com a Organização Mundial da Saúde, o descarte de medicamentos é a eliminação de todos os produtos farmacêuticos vencidos, derramados ou contaminados e os medicamentos que não são úteis e precisam ser descartados de maneira adequada. **Objetivo:** caracterizar os medicamentos descartados na Costa Rica durante o 2019, com o sistema de coleta de uma empresa que coleta medica-

mentos fora de uso. **Materiais e métodos:** foi realizado um estudo observacional, descritivo-analítico e transversal. O estudo foi realizado nas instalações da empresa MPD em Curridabat, San José, onde estão armazenados os contentores da empresa. Os dados obtidos foram depositados em banco de dados elaborado no Excel 2016. **Resultados:** a maioria dos medicamentos vencidos era para uso humano, principalmente para adultos, a forma farmacêutica mais comum foi a enteral, do setor privado e nacional. Existe uma relação significativa entre o estado dos medicamentos e sua origem, bem como entre a origem e a forma farmacêutica. Não existe relação significativa entre a forma farmacêutica dos medicamentos e o seu estado de saúde, nem entre a nacionalidade e o estado de saúde. **Conclusões:** a condição de desuso foi a mais prevalente entre os medicamentos descartados. O princípio ativo mais descartado foi o paracetamol e o principal grupo farmacológico encontrado nos produtos descartados foram os analgésicos.

Palavras-chave: disposição final, uso de medicamentos, resíduos, reciclagem, armazenamento de medicamentos.

INTRODUCCIÓN

El desecho de medicamentos es la eliminación de todos aquellos productos farmacéuticos que han expirado, derramado o contaminado; vacunas y medicamentos que no son de utilidad y necesitan disponerse de forma adecuada. Los fármacos no utilizables son todos aquellos que han sido devueltos por los pacientes luego de haber salido de la farmacia y que no cumplen con criterios de calidad, se encuentran contaminados, deteriorados, falsificados o adulterados o fueron almacenados en condiciones no recomendadas. Los medicamentos vencidos han superado la fecha de vencimiento aun si se ha almacenado bajo las condiciones recomendadas, por esta razón es exigido que se incluya la fecha de vencimiento en los medicamentos de venta con o sin receta médica [1-3].

Varios países cuentan con estrategias para desechar los medicamentos adecuadamente. Por ejemplo, en México, se dispone del Plan Integral de Fomento Sanitario para el manejo adecuado de los medicamentos caducos en toda la cadena comercial y el Sistema Nacional de Gestión de Residuos de Envases de Medicamentos (Singrem) [4]. España posee una Ley de Envases y Residuos de Envases en la que se estableció un sistema integrado para recolección, tratamiento, recuperación, reciclaje y valorización de los envases y los residuos. También existe la Sociedad Integrada de Gestión y Recogida de Envases (Sigre), los envases de medicamentos que llevan incorporado el símbolo de Sigre indican al paciente que el producto puede ser depositado en los contenedores que se encuentran en las farmacias [5]. Por su parte, Portugal, de igual forma, implementó

el Sistema Integrado de Recolha de Embalagens e Medicamentos fora de uso (Sigrem), las farmacias brindan espacio para la recolección y los farmacéuticos asesoran a los ciudadanos sobre la eliminación de productos farmacéuticos [6].

En Costa Rica, la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) cuenta con una norma para la eliminación de medicamentos no utilizables y trabaja de la mano con la empresa Manejo Profesional de Desechos, S.A. (MPD), encargada del transporte de los mismos y su tratamiento. De otro lado, el Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica (Colfar) cuenta con un centro de acopio permanente. Punto Seguro es una empresa que tiene como propósito la recolección de medicamentos caducados o no utilizados, las farmacias que desean participar en esta iniciativa se inscriben y colocan contenedores para que los individuos puedan depositar los productos farmacéuticos que no utilizan, en mal estado o en desuso y, con ayuda de la empresa, se encargan de la disposición final de los medicamentos [1].

Hoy en día, algunos países no tienen programa de recolección o eliminación domiciliares vencidos o en desuso, por ejemplo, Uruguay ha promulgado decretos y leyes sobre esta temática, pero aún no existe una normativa sobre la disposición de medicamentos de los hogares.

La disposición inadecuada de medicamentos genera una problemática a nivel ambiental. Se han encontrado principios activos, excipientes y sustancias activas derivadas de medicamentos en ecosistemas acuáticos y terrestres. Algunos grupos terapéuticos como agentes citotóxicos, antibióticos, medicamentos hormonales, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Aines) y antidepresivos tienen efectos sobre la reproducción, fallo renal, muerte, resistencia a antibióticos y desórdenes endocrinos en diferentes especies animales [7-9].

De forma global existen actividades para el control de medicamentos como la farmacovigilancia que detecta, supervisa, monitorea, valora y evalúa los datos relacionados con peligros humanos causados por la medicina para reducir la aparición de reacciones adversas a medicamentos en los pacientes [10, 11]. Pero actividades como la ecofarmacovigilancia, relacionadas con el efecto de los medicamentos en el medio ambiente, son poco conocidas. La ecofarmacovigilancia se describe como la ciencia y las actividades relacionadas con la detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos de los fármacos en el medio ambiente, por lo tanto, abarca desde la producción hasta la eliminación de los medicamentos [9-12].

Por ende, es necesario hacer un estudio que oriente a las personas y las concienticen más sobre los desechos de medicamentos y el impacto que estos pueden generar en la salud de las personas y en el medio ambiente. Así, el objetivo de esta investigación

es analizar los medicamentos desechados en Costa Rica, haciendo uso del sistema de recolección de la empresa Punto Seguro, para la identificación de las características de los mismos.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio observacional, descriptivo-analítico y de corte transversal. La recopilación de los datos se efectuó a través del inventario de medicamentos desechados en los contenedores de la empresa Punto Seguro localizados en San José, Alajuela, Heredia, Cartago, Guanacaste y Puntarenas. El estudio se desarrolló en las instalaciones de la empresa MPD en Curridabat, San José, donde se almacenan los contenedores de Punto Seguro. Se trabajó con todos los medicamentos recolectados durante el 2019. Se consideraron como válidos los datos de los productos de distintas procedencias, de uso enteral, parenteral, ótico, oftálmico, tópico y nasal, así como los de uso veterinario y humano (pediátricos y adultos).

Primero, se llevó a cabo el conteo de fármacos dentro de la empresa y se seleccionaron bolsas almacenadas en contenedores, se abrieron y sobre bandejas se agruparon las diferentes formas farmacéuticas para los diferentes principios activos. Seguidamente, se recolectó la información sobre los fármacos, mediante un instrumento desarrollado por los investigadores donde se tuvo en cuenta información sobre la frecuencia de aparición y la cantidad de cada forma farmacéutica, la procedencia tanto de fabricación y la nacionalidad (extranjera o nacional), la condición (desuso, deteriorado o vencido), el uso (humano o veterinario), la población meta (adulto o pediátrico), la potencia, principio activo y marca de cada fármaco, así como el grupo farmacológico. Para mantener la confidencialidad de los laboratorios fabricantes se utilizó un código numérico para identificarlos.

Posteriormente, se colocaron en bandejas para que se procediera a eliminarlos según los protocolos establecidos. Los datos obtenidos se depositaron en una base de datos elaborada en Excel 2016. Se reportó la estadística descriptiva de los datos, representándose de forma gráfica algunos de ellos, para lo que se tomó en cuenta los datos unitarios obtenidos de cada forma farmacéutica, mientras que para las pruebas analíticas de datos se utilizó la frecuencia de aparición de los principios activos contenidos en sus empaques. Se efectuó la prueba de chi cuadrado para establecer si existían asociaciones de significancia, entre el estado o condición de los medicamentos y su origen, entre el origen y la forma farmacéutica y de igual manera entre la forma farmacéutica o la nacionalidad de los medicamentos, con la condición de estos. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Científico encargado de trabajos finales de graduación de la Facultad de Farmacia de la Universidad Latina de Costa Rica.

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 127 454 unidades de productos desechados procedentes de 1459 medicamentos. Se encontró que 73 735 (57,85%) estaban en desuso, 924 (0,73%) estaban deteriorados y 52 795 (41,42%) estaban vencidos. Se identificó que 127 330 (99,9%) unidades de fármacos eran de uso humano y 124 (0,10%) de uso veterinario. Se observó que 88 142 (69,15%) unidades eran medicamentos procedentes de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), 33 134 (26,0%) del sector privado y 6178 (4,85%) eran muestras médicas. De las formas farmacéuticas encontradas 126 208 (99,02%) fueron enterales, 49 nasales (0,04%), 138 oftálmicos (0,11%), 33 óticos (0,03%), 500 parenterales (0,39%) y 526 tópicos (0,41%). Además, 357 unidades de medicamentos (0,28%) eran de uso pediátrico, mientras que los restantes 127 097 medicamentos (99,72%) eran de uso en adultos. Por otro lado, se encontró 125 058 (98,12%) unidades nacionales y 2396 (1,88%) extranjeros.

En la figura 1 se muestra el total de unidades de formas farmacéuticas, según principio activo, desechados mediante el centro recolector y se detallan aquellos que se encontraron en mayor cantidad. Como ya se ha mencionado, el paracetamol fue el principio activo del que se desechó mayor cantidad de producto (11,5%).

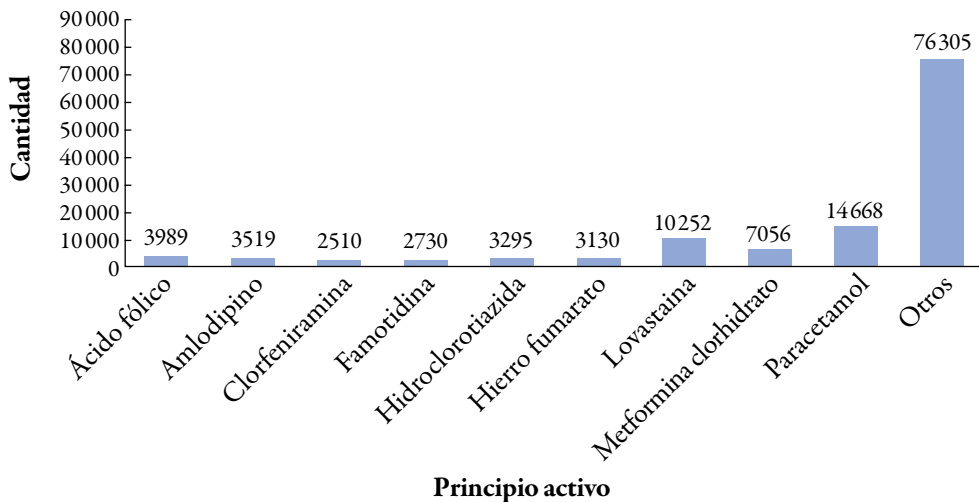


Figura 1. Unidades de formas farmacéuticas, según principio activo, desechados en Costa Rica durante el 2019, a través del sistema de centros de acopio de la empresa de recolección de medicamentos en desuso. Fuente: elaboración propia.

Los principales grupos farmacológicos a los cuales pertenecen los medicamentos desechados se muestran en la figura 2, los analgésicos (11,9%) fueron los más desechados, seguido de los reguladores de lípidos (10,2%).

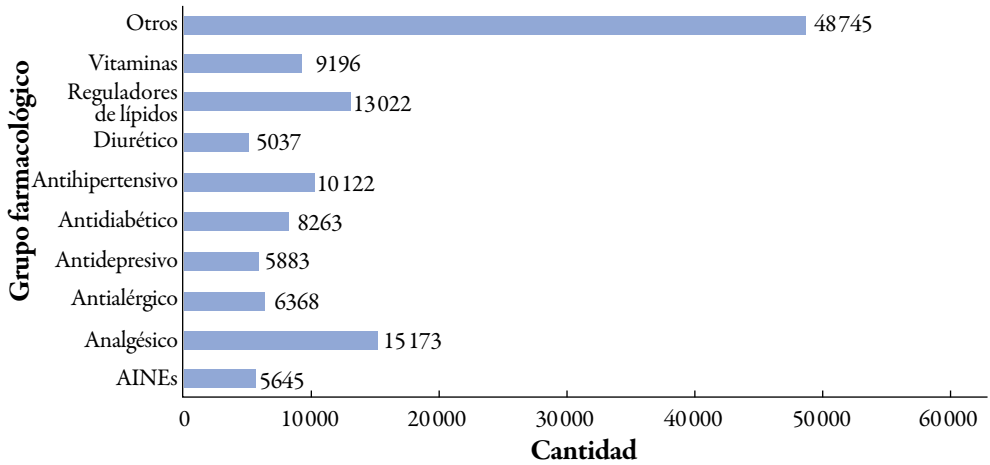


Figura 2. Unidades de medicamentos, según grupos farmacológicos más desechados durante el 2019, a través del sistema de centros de acopio de la empresa de recolección de medicamentos en desuso. Fuente: elaboración propia.

Los laboratorios fabricantes con mayores cantidades de muestras médicas descartadas se muestran en la figura 3, donde se aprecia al laboratorio #002 (33,86%) como el principal, con una gran ventaja sobre el laboratorio #001 (13,33%), ambos de origen nacional. La categoría *otros* #009 (27,65%) agrupa diferentes laboratorios que no se encontraban en los ocho principales.

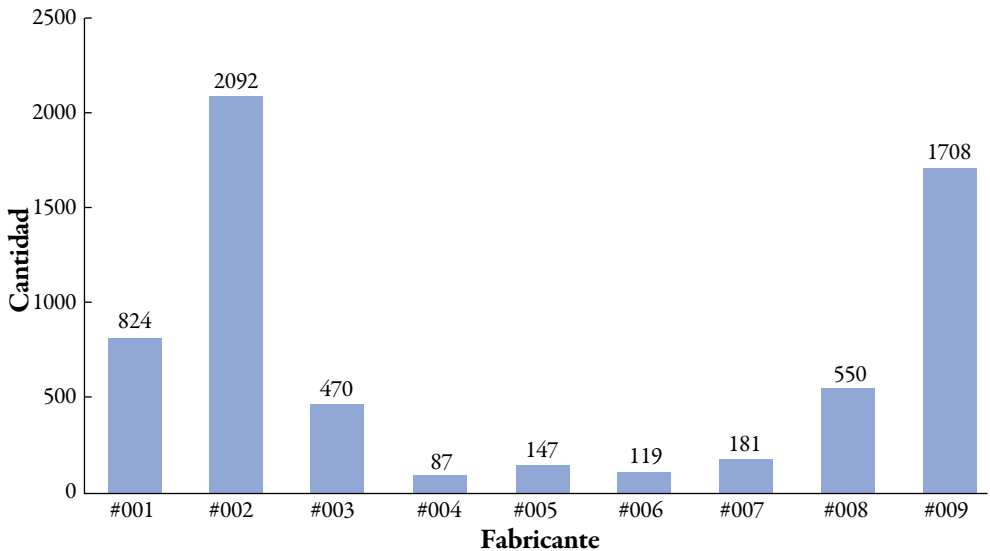


Figura 3. Principales fabricantes de muestras médicas que fueron desechadas en Costa Rica durante el 2019, a través del sistema de centros de acopio de la empresa de recolección de medicamentos en desuso. Fuente: elaboración propia.

En la tabla 1 se observa la relación entre el origen, la forma farmacéutica y la nacionalidad de los medicamentos, con la condición de estos. Se identificó que los medicamentos procedentes de la CCSS se encuentran mayoritariamente en desuso (50,7%), mientras que los del sector privado la mayoría se encuentran vencidos (71,2%). En cuanto a las formas farmacéuticas, la mayoría son medicamentos vencidos, excepto para los oftálmicos, que se encuentran principalmente en desuso (58,1%). De acuerdo con la nacionalidad, tanto los extranjeros como los nacionales, la mayor cantidad se encuentran vencidos. Los valores p obtenidos muestran que existe dependencia entre la condición de los productos farmacéuticos y su origen, mientras que no existe dependencia de la condición de los medicamentos con su forma farmacéutica ni con su nacionalidad.

Tabla 1. Condición de los medicamentos desechados en Costa Rica en 2019, de acuerdo con su origen, forma farmacéutica y nacionalidad.

Variable	Condición				Valor chi	Valor p
	Desuso (%)	Deteriorado (%)	Vencido (%)	Total (%)		
Origen						
CCSS	223 (50,7)	13 (2,9)	204 (46,4)	440 (30,2)	88,50	<0,05
Privado	162 (25,1)	24 (3,7)	459 (71,2)	645 (44,2)		
Muestras médicas	116 (31,1)	2 (0,5)	256 (68,4)	374 (25,6)		
Forma farmacéutica						
Enteral	412 (34,3)	35 (2,9)	755 (62,8)	1202 (82,4)	12,57	0,25
Nasal	5 (29,4)	0	12 (70,6)	17 (1,2)		
Oftálmico	18 (58,1)	1 (3,2)	12 (38,7)	31 (2,1)		
Ótico	5 (33,3)	0	10 (66,7)	15 (1,0)		
Parenteral	21 (27,6)	2 (2,6)	53 (69,7)	76 (5,2)		
Tópico	40 (33,9)	1 (0,8)	77 (65,3)	118 (8,1)		
Nacionalidad						
Extranjero	8 (17,8)	2 (4,4)	35 (77,8)	45 (3,1)	5,87	0,05
Nacional	493 (34,9)	37 (2,6)	884 (62,5)	1414 (96,9)		
Total	501	39	919	1459	----	----

Fuente: elaboración propia.

En la tabla 2 se muestran las formas farmacéuticas de acuerdo con su origen institucional, el sector privado aportó más productos de uso enterales para desecho. Además, se muestra la dependencia del origen del producto y su vía de administración.

Tabla 2. Origen de los medicamentos desechados en Costa Rica en 2019, de acuerdo con su forma farmacéutica.

Variable	Origen				Valor chi	Valor p
	CCSS (%)	Muestra Medica (%)	Privado (%)	Total		
Enteral	347 (28,9)	336 (27,9)	519 (43,2)	1202	32,76	<0,05
Nasal	7 (41,2)	5 (29,4)	5 (29,4)	17		
Oftálmico	14 (45,2)	2 (6,4)	15 (48,4)	31		
Ótico	1 (6,7)	3 (20,0)	11 (73,3)	15		
Parenteral	29 (38,2)	7 (9,2)	40 (52,6)	76		
Tópico	42 (35,6)	21 (17,8)	55 (46,6)	118		
Total	440	374	645	1459		

Fuente: elaboración propia.

DISCUSIÓN

Se presenta esta investigación como la primera en su tipo en Costa Rica, anteriormente, se han realizado caracterizaciones de medicamentos desechados, pero con una muestra más pequeña, sólo medicamentos reportados después de una campaña de recolección, por lo que esta es la primera vez que se logra hacer con fármacos recolectados durante todo un año a nivel nacional.

De acuerdo con los datos obtenidos, más de la mitad de los medicamentos desechados se encontraban en desuso, lo cual no es sorpresa ya que, como explica la OMS, la mitad de la población no toma sus medicamentos correctamente, no completan los tratamientos, o adquieren medicamentos que no requieren, los compran sólo como prevención [13]. Ehrhart *et al.* [14] indicaron que varios estudios sobre disposición de medicamentos por parte de consumidores han informado que hasta el 94-97% de los consumidores tienen medicamentos sobrantes en su casa, por lo que, los hogares se convierten en lugares de almacenamiento de fármacos, debido al desconocimiento de los métodos para desecharlos y cuando las personas se dan cuenta de la cantidad tan grande que tienen y el poco espacio en los botiquines, esto proporciona una oportunidad para compartir con amigos y familiares [15]. Según Castro, Tobón y Martínez [16], otros motivos por los que los usuarios han indicado que dejan sus medicamentos son: que olvidan terminar el tratamiento, se sienten mejor antes de que acabe el tratamiento, cambio de tratamiento o consideran que los medicamentos no funcionaban y, por ende, los dejan.

De acuerdo con González [17], en los últimos años hubo avances en cuanto a la farmacología pediátrica, sin embargo, existe una importante falta de recursos terapéuticos para esta población. Esto podría explicarse porque la mayoría son fármacos dirigidos a adultos. Esto a diferencia de un estudio realizado en México, donde los medicamentos pediátricos se encontraron en el segundo lugar de fármacos almacenados en el hogar, estos terminaron en desuso, ya que también se mostró que los conservan durante un año o hasta que caducaran [18].

El paracetamol fue el principio activo más desechado, seguido de la lovastatina y la metformina y los principales grupos farmacológicos descartados fueron los analgésicos, los reguladores de lípidos y los antihipertensivos. Se observó la tendencia a que los medicamentos más desechados son aquellos de uso crónico, esto puede deberse a que, el empleo de estatinas de menor potencia como la lovastatina, son aceptables para intentar reducir el riesgo en aquellos pacientes que no toleran las dosis de alta intensidad recomendadas, pero al ser de intensidad moderada-baja, no en todos los casos funciona. Sin embargo, es la única opción a nivel público en Costa Rica. Esto conlleva que las personas dejen de utilizar este medicamento y busquen mejores opciones a nivel privado [19]. La metformina es eficaz contra la diabetes *mellitus* tipo 2, es accesible en el mercado y no sólo trata los síntomas, sino que se utiliza en poblaciones en riesgo. Por eso, este medicamento es recetado a muchos pacientes, pero la mayoría no lo utiliza y es desechado [20]. En cuanto a los antihipertensivos, debido a que la hipertensión arterial es de las enfermedades crónicas más incidentes, no es sorpresa que estos sean muy utilizados y puedan generar desechos.

Esto puede suceder porque existe una mala adherencia al tratamiento, debido a diversos factores, como el socioeconómico, seguimiento por parte de trabajadores de la salud, factores relacionados con la enfermedad, tratamiento o el paciente [21]. En una encuesta realizada en línea a estudiantes universitarios en Vermont, también se demostró que, el 50% de quienes llevaban un tratamiento prescrito por un médico para un padecimiento crónico, dejaron de utilizarlo una vez que se sienten mejor, los guardaron y no los volvieron a usar, mientras que, el 13% decidió depositarlos en la basura, convirtiéndolos así en medicamentos ampliamente desechados debido a su mal uso [22].

Por su parte, los analgésicos son muy utilizados en la práctica clínica habitual, con una gran variedad de indicaciones, es la causa más frecuente de visita médica [23-25]. Sin embargo, las diferencias entre los distintos analgésicos obligan a individualizar su uso en función del tipo de dolor; si se toma en cuenta que el dolor es un síntoma muy presente en distintas enfermedades y de igual forma se presenta como enfermedad por sí sola. Desde el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) anunciaron el alivio del dolor como

un derecho humano fundamental [26]. Al ser tan frecuente, las personas buscan el alivio de dolores por ellos mismos, provocando que la automedicación sea mayor [27]. De acuerdo con Chacko *et al.* [28], estos fármacos son los productos de venta libre que mayoritariamente se encuentran en las casas de los consumidores para utilizarlos en futuros padecimientos o malestares, lo cual puede conducir a que el medicamento expire o no sea utilizado. Esto explicaría por qué el paracetamol es el medicamento más desechado, puesto que es bastante utilizado para padecimientos que causan dolor, tanto que en la CCSS se receta frecuentemente, sin embargo, varias personas no creen que sea eficaz, por lo tanto, no lo utilizan a pesar de que lo retiran de la institución.

Los datos de las muestras médicas son importantes porque demuestran que se invierte en medicamentos que no son manejados o utilizados correctamente por los médicos, farmacéuticos o pacientes, probablemente, porque según el reglamento de la visita médica, las muestras médicas únicamente se entregan a profesionales en ciencias de la salud para apoyar la información sobre el medicamento y prohíbe su venta o comercialización. La mayoría de los médicos y farmacéuticos no los utilizan y llegan a deteriorarse o a caducar. Esto hay que tomarlo en cuenta para considerar la posibilidad de invertir menos en muestras médicas [1, 29, 30].

En primer lugar, existe una relación dependiente entre el estado de los medicamentos y su origen ($\chi^2=88,50$, $p=0,05$), se observa que, la mayoría de los medicamentos provenientes de la CCSS no son utilizados, mientras que los del sector privado, terminan vencidos. Esto puede ser consecuencia de que la institución entrega más medicamentos de lo necesario a los pacientes, por ejemplo, en casos en donde se entreguen medicamentos que tienen efectos secundarios a nivel gástrico, al paciente se le da un medicamento protector, pero estos efectos adversos no siempre se presentan y el medicamento se desperdicia por no ser utilizado. Esto representa un gasto, porque ante la entrega de un medicamento por parte de la CCSS, existe una consulta, una receta y un servicio de atención que no el paciente no aprovecha.

En segundo lugar, la forma farmacéutica ($\chi^2=12,57$, $p=0,25$) no tienen una relación de asociación con la condición de los medicamentos, pues los medicamentos se vencen sin importar cuál sea la forma. Debido a que los medicamentos administrados por vía parenteral, oftálmico, ótico, tópico y nasal tienen un uso específico y cuando el padecimiento mejora y la persona se recupera, ya no se emplean. A diferencia de los enterales que la mayoría de las personas los guardan para volverlos a consumir en caso de ser necesario.

En tercer lugar, existe relación entre el origen de los medicamentos y la forma farmacéutica ($\chi^2=32,76$, $p<0,05$), lo cual no ha sido reportado en ningún otro estudio.

Los datos muestran que la mayoría de las fórmulas enterales provienen del sector privado. Estos datos no concuerdan con los reportados por Rodríguez [31], en este estudio se estableció que la mayoría de los medicamentos recolectados provienen de la CCSS. En el caso de los medicamentos nasales estos principalmente provienen de la CCSS, posiblemente debido a la parte económica ya que, estos fármacos sólo se utilizan cuando se presentan los síntomas y deben desecharse después de determinado tiempo generando un mayor costo para los pacientes a nivel privado.

CONCLUSIONES

La condición de desuso fue la que más prevaleció en los medicamentos desechados. Además, en su mayoría provenían de la CCSS y eran de uso enteral. El principio activo más desechado fue el paracetamol y el principal grupo farmacológico encontrado en los productos desechados fue el de los analgésicos. Los laboratorios a los cuales pertenecían la mayoría de las muestras médicas descartadas son nacionales. El 25 % del total de medicamentos recolectados correspondían a muestras médicas, por lo que se determina que su distribución debe ser más controlada, para que no se desperdicien medicamentos. Se determinó una relación entre la condición de los medicamentos y su origen, así como entre el origen y la forma farmacéutica. No existe relación entre la forma farmacéutica de los medicamentos y la condición de estos, al igual que entre la nacionalidad y la condición. Es necesario una mayor concientización desde el correcto uso de medicamentos, revisión periódica de botiquines, la no acumulación de medicamentos y principalmente del correcto desecho de medicamentos. Lo cual sería un paso hacia la ecofarmacovigilancia.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores María José Muñoz Bejarano, Yoselyn Ruiz Rodríguez y Ramsés Alfaro Mora no reportan conflictos de intereses que puedan influir inapropiadamente en el desarrollo de esta investigación. El autor Gustavo Sáenz García reporta su participación dentro de la empresa de recolección de medicamentos en desuso, al brindar su apoyo logístico para que esta investigación se llevara a cabo.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

María José Muñoz Bejarano y Yoselyn Ruiz Rodríguez: concepción del estudio, recopilación de datos, levantamiento de base de datos, análisis de datos y escritura del manuscrito.

Gustavo Sáenz García: facilitación de infraestructura, apoyo logístico, análisis de datos y revisión del manuscrito.

Ramsés Alfaro Mora: supervisión, análisis de datos, redacción del manuscrito, revisión crítica y aprobación de la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

1. F. Carvajal, J.J. Mora, Medicamentos no utilizables: Problemática y medidas pertinentes para su disposición final, *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica.*, **10**(1), 27-36 (2016).
2. Poder Ejecutivo, Decreto 36039, *Reglamento para la disposición final de medicamentos, materias primas, y sus residuos*, URL: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=68197&nValor3=81183&strTipM=TC, consultado en febrero de 2020.
3. USA Food & Drug Administration, *No caiga en la tentación de usar medicinas vencidas*, URL: <https://www.fda.gov/drugs/special-features/no-caiga-en-la-tentacion-de-usar-medicinas-vencidas>, consultado en febrero del 2020.
4. C. Jáuregui, L. Ramos, J. Figueroa, R. Medina, I. Rodríguez, R. Padilla, México hacia una cultura sobre la disposición final de medicamentos caducados, *Revista Fuente Nueva Época*, **6**(20), 24-31 (2015).
5. A. Pérez, V. Baixauli, Tratamiento residual de los medicamentos (I). Envases y residuos, *OFFARM*, **20**(4), 114-122 (2001).
6. A. Maghear, *Unused Pharmaceuticals Where Do They End Up? United Kingdom*, Health Care Without Harm Europe, 2013, pp. 22-24.
7. Y.A. García, Medicamentos caducos: una problemática social, *Revista Salud Pública y Nutrición, RESPYN*, **9**(1), 1-2 (2008).
8. European Commission, *Pharmaceuticals in the environment*, URL: https://ec.europa.eu/commission/news/pharmaceuticals-environment-2019-mar-11_en, consultado en febrero del 2020.
9. D.M. Quijano-Prieto, J.G. Orozco-Díaz, E. Holguín-Hernández, Conocimientos y prácticas de pacientes sobre disposición de medicamentos no consumidos.

- Aproximación a la ecofarmacovigilancia, *Revista de Salud Pública*, **18**(1), 61-71 (2016).
10. Ministerio de Salud Pública, Farmacovigilancia, URL: <https://www.ministerio-desalud.go.cr/index.php/regulacion-de-la-salud/farmacovigilancia>, consultado en febrero del 2020.
 11. J. Roldán, Farmacovigilancia: datos sobre el estado actual de esta disciplina en Chile, *Revista Médica Clínica Las Condes*, **27**(5), 585-593 (2016).
 12. A. González, W. Montoya, Ecofarmacovigilancia, *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR- HSJD*, **5**(4), 1-7 (2015).
 13. World Health Organization, *The World Medicines Situation Report*, URL: https://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/en/, consultado en septiembre del 2020.
 14. A.L. Ehrhart, E.F. Granek, M. Nielsen-Pincus, D.A. Horn, Leftover drug disposal: Customer behavior, pharmacist recommendations, and obstacles to drug take-back box implementation, *Waste Management*, **118**, 416-425 (2020).
 15. S. Logesh-Kumar, Logeshwaran, R. Nagasubramanian-Vanitha, P. Thennarasu, M. Keerthana, M. Lavanya, Assessment of knowledge and awareness on the disposal of expired and unused medicines among medication consumers, *Journal of Young Pharmacists*, **11**(4), 410-416 (2019).
 16. J. Castro, Y. Tobón, A.J. Martínez, Conocimiento y prácticas sobre almacenamiento de medicamentos en habitantes de un barrio de Cali, Colombia, *Revista Cubana de Farmacia*, **52**(2), 1-12 (2019).
 17. C. González, Farmacología del paciente pediátrico, *Revista Médica Clínica Las Condes*, **27**(5), 652-659 (2016).
 18. 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 y Administración*, **4**(12), 15-23 (2017).
 19. Sociedad Argentina de Cardiología, Uso apropiado de las estatinas en la Argentina, *Revista Argentina de Cardiología*, **86**(1), 3-13 (2018).
 20. Y. Salazar, Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II, *Revista Cubana de Farmacia*, **45**(1), 157-166 (2011).

21. L.E. Ramos. La adherencia al tratamiento en las enfermedades crónicas, *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascular*, **16**(2), 175-189 (2015).
22. C. Vatovec, E. Van Wagoner, C. Evans, Investigating sources of pharmaceutical pollution: Survey of over-the-counter and prescription medication purchasing, use, and disposal practices among university students, *Journal of Environmental Management*, **198**, 348-352 (2017).
23. F. Puebla, Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. Dolor iatrogénico, *Oncología (Barcelona)*, **28**(3), 33-37 (2005).
24. A. Calsin, N. Moreno, J. González, L. Solsona, J. Porta, Prevalencia del dolor como motivo de consulta y su influencia en el sueño: experiencia en un centro de atención primaria, *Atención Primaria*, **43**(11), 568-576 (2011).
25. M.C. López, M. Sánchez, M.C. Rodríguez, E. Vázquez, Cavidol: calidad de vida y dolor en atención primaria, *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, **14**(1), 9-19 (2007).
26. L. LeResche, International Association for the Study of Pain. 11th World Congress on Pain. August 21-26, 2005, Sydney, Australia, *Journal of Orofacial Pain*, **19**(4), 345-346 (2005).
27. A. Segura, Políticas de salud (actuaciones poblacionales) en los servicios asistenciales. Informe Sespas, *Gaceta Sanitaria*, **22**(1), 104-110 (2008).
28. C. Chacko, D. Prakash, P. Hafsa, J. Lallu, A.R. Shabaraya, A review on the attitude and practice on self-medication, storage, and disposal of drugs in a community, *International Journal of Research and Review*, **7**(8), 122-129 (2020)
29. Poder Ejecutivo, Decreto 26374, *Reglamento de la visita médica*, URL: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=43944&nValor3=46297&strTipM=TC, consultado en septiembre del 2020.
30. R.O. Florián-Castro, Percepción sobre promoción farmacéutica y prescripción de medicamentos en médicos de Lima, Perú 2016, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, **35**(4), 708-711 (2018).
31. J. Benedí, C. Romero, Descongestivos nasales, *Farmacia Profesional*, **20**(1), 58-61 (2006).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.J. Muñoz-Bejarano, Y. Ruiz, G. Sáenz-García, R. Alfaro-Mora, Análisis del desecho de medicamentos en Costa Rica durante el 2019, un paso hacia la ecofarmacovigilancia, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 423-438 (2021).

Síntesis en fase sólida de un neuropéptido cosmecéutico y su microencapsulación en un sistema liposomal

J. Andrés Sandoval A., Jaiver E. Rosas P.*

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Carrera 30 N.º 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

*Autor de correspondencia: jerosasp@unal.edu.co

Recibido: 6 de enero de 2021

Revisado: 21 de febrero de 2021

Aceptado: 25 de febrero de 2021

RESUMEN

Introducción: actualmente los péptidos sintéticos se han constituido en una novedosa alternativa para el tratamiento de la piel envejecida. Acetilhexapéptido-3 (Ac-EEMQRR-NH₂) ha sido utilizado para inducir reducción de líneas de expresión de manera análoga a la toxina botulínica, pero sin efectos tóxicos. **Objetivo:** sintetizar el acetilhexapéptido-3 y desarrollar un sistema liposomal para su encapsulación y favorecer su paso a través de una membrana modelo. **Metodología:** el péptido fue obtenido mediante síntesis en fase sólida (SFS) empleando la estrategia Fmoc/tBu, fue purificado y plenamente caracterizado. El sistema liposomal con acetilhexapéptido-3 encapsulado fue desarrollado mediante la formación de una emulsión con posterior inversión de fase por evaporación del solvente orgánico. Los sistemas fueron caracterizados en su tamaño, potencial zeta, eficiencia de encapsulación del neuropéptido y de manera preliminar se realizó un estudio de permeabilidad *ex vivo*. **Resultados:** es posible sintetizar péptidos cortos con alto grado de pureza y buen rendimiento, utilizando la metodología de SFS Fmoc/tBu. De acuerdo con la caracterización, el sistema liposomal adelantado sugiere una buena estrategia para la encapsulación del acetilhexapéptido-3 y su potencial aplicación en el desarrollo un novedoso producto cosmecéutico.

Palabras clave: péptidos sintéticos, liposomas, microencapsulación.

SUMMARY

Solid phase synthesis of a cosmeceutical neuropeptide and its microencapsulation in a liposomal system

Introduction: currently synthetic peptides have become a novel alternative for the treatment of aging skin. Acetylhexapeptide-3 (Ac-EEMQRR-NH₂) has been used to induce reduction of expression lines in a manner analogous to botulinum toxin, but without toxic effects. **Aim:** to synthesize acetylhexapeptide-3 and to develop a liposomal system for its encapsulation and favor its passage through a model membrane. **Methodology:** the peptide was obtained by solid phase synthesis (SFS) using the Fmoc / tBu strategy, it was purified and fully characterized. The liposomal system with encapsulated acetylhexapeptide-3 was developed by forming an emulsion with subsequent phase inversion by evaporation of the organic solvent. The systems were characterized in their size, zeta potential, neuropeptide encapsulation efficiency and a preliminary ex vivo permeability study was carried out. **Results:** it is possible to synthesize short peptides with a high degree of purity and good yield, using the SFS Fmoc / tBu methodology. According to the characterization, the advanced liposomal system suggests a good strategy for the encapsulation of acetylhexapeptide-3 and its potential application in the development of a novel cosmeceutical product.

Keywords: synthetic peptides, liposomes, microencapsulation.

RESUMO

Síntese de fase sólida de um neuropeptídeo cosmecêutico e sua microencapsulação em um sistema lipossomal

Introdução: atualmente os peptídeos sintéticos têm se tornado uma nova alternativa para o tratamento do envelhecimento cutâneo. O acetilhexapeptídeo-3 (Ac-EEMQRR-NH₂) tem sido usado para induzir a redução das linhas de expressão de maneira análoga à toxina botulínica, mas sem efeitos tóxicos. **Objetivo:** sintetizar acetilhexapeptídeo-3 e desenvolver um sistema lipossomal para seu encapsulamento e favorecer sua passagem por uma membrana modelo. **Metodologia:** o peptídeo foi obtido por síntese em fase sólida (SFS) utilizando a estratégia Fmoc / tBu, foi purificado e totalmente caracterizado. O sistema lipossomal com acetilhexapeptídeo-3 encapsulado foi desenvolvido pela formação de uma emulsão com subsequente inversão de fase por evaporação do solvente orgânico. Os sistemas foram caracterizados quanto ao

tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação de neuropeptídeos e um estudo preliminar de permeabilidade *ex vivo* foi realizado. **Resultados:** é possível sintetizar peptídeos curtos com alto grau de pureza e bom rendimento, utilizando a metodologia SFS Fmoc / tBu. De acordo com a caracterização, o sistema lipossomal avançado sugere uma boa estratégia para a encapsulação do acetilhexapeptídeo-3 e seu potencial aplicação no desenvolvimento de um novo produto cosmecéutico.

Palavras-chave: peptídeos sintéticos, lipossomas, microencapsulação.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos y las proteínas son moléculas que participan en la mayoría de los procesos biológicos que tienen lugar en los organismos vivos. Por esta razón, han sido el foco de numerosas investigaciones en las últimas décadas y se han constituido en una poderosa alternativa para el desarrollo de productos farmacéuticos de última generación. Como producto de estas investigaciones se han reportado moléculas peptídicas con diversas actividades biológicas: antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antihipertensivos, citomoduladores e inmunomoduladores, entre otros. Lo anteriormente descrito refleja el creciente interés en la terapéutica basada en productos farmacéuticos que contienen péptidos sintéticos como ingrediente activo. Actualmente, en el campo farmacéutico, se estima que más de 60 fármacos peptídicos han sido aprobados, alrededor de 155 candidatos peptídicos se encuentran en estudios clínicos y se adelantan estudios preclínicos con más de 500 moléculas de esta naturaleza [1, 2].

De manera análoga, en el desarrollo de productos cosmecéuticos, los péptidos se han convertido en una nueva alternativa para el tratamiento del envejecimiento de la piel. Se ha reportado que algunos péptidos juegan un papel importante en la modulación de la proliferación celular, la migración celular, la inflamación, la angiogénesis y la melanogénesis [3]. En el campo cosmético, entre este tipo de moléculas se destaca el neuropéptido Ac-EEMQRR-NH₂, también conocido como Argireline. Este péptido de naturaleza hidrofílica corresponde a una secuencia de seis aminoácidos, la cual presenta un grupo acetilo en el extremo N-terminal y la función amida en el extremo C-terminal. La secuencia es derivada de la región N-terminal de la proteína SNAP-25, esta se asocia con la proteína sinaptobrevina y la proteína syntaxina para formar el complejo SNARE, que es esencial para la liberación del neurotransmisor acetilcolina, este favorece la contracción muscular. El acetilhexapéptido-3 compite con la proteína SNAP-25, alterando la formación del complejo SNARE e inhibiendo la liberación de acetilcolina, lo que genera la parálisis muscular local de manera temporal; mecanismo mediante el cual se sugiere son atenuadas las líneas de expresión [4]. Adicionalmente,

se ha reportado que este neuropéptido es totalmente inocuo, a diferencia de la toxina botulínica [5]. Es posible obtener las moléculas peptídicas como producto de hidrólisis de proteínas, mediante la tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Es posible llevar a cabo la síntesis química en solución o SFS, esta es considerada una de las rutas más viables para la obtención de péptidos sintéticos de bajo peso molecular [6, 7].

Los péptidos sintéticos presentan una actividad biológica altamente específica y un perfil de seguridad bastante bueno, pero se ha reportado que son muy sensibles al ataque enzimático y pueden ser inestables a las variaciones de pH y temperatura, por lo que presentan una vida media relativamente corta y se requiere administrar dosis muy altas, preferiblemente, por vía parenteral [8-10]. Adicionalmente, estas moléculas, en casos particulares, presentan propiedades biofarmacéuticas como baja solubilidad acuosa y dificultad para permear membranas biológicas. Para superar estos inconvenientes, la investigación sobre tecnología farmacéutica ha aumentado, específicamente, en el diseño y desarrollo de sistemas no convencionales para su administración, con el propósito de obtener productos farmacéuticos más seguros, estables y eficaces. Entre los sistemas estudiados para la administración de péptidos sintéticos se destacan los liposomas, las microemulsiones y las micro y nanopartículas de diversa naturaleza [11-13]. Los liposomas se han utilizado como sistemas para la liberación no convencional de numerosos ingredientes farmacéuticos activos (IFA) anticancerígenos, antibióticos y antifúngicos, entre otros. Estos sistemas permiten minimizar efectos adversos asociados con IFA y posibilitan su administración por diferentes vías [14, 15]. Por otra parte, en el campo de los productos cosmeceúticos, los liposomas han sido ampliamente estudiados por su benéfico efecto sobre la piel y también como sistema para la administración de ingredientes activos [16].

En este contexto, el objetivo de este estudio fue sintetizar el neuropéptido Ac-EEMQRR-NH₂ mediante SFS y, posteriormente, desarrollar un sistema liposomal para su microencapsulación. El acetilhexapéptido-3 se sintetizó empleando la estrategia Fmoc/tBu y se caracterizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), espectrometría de masas (ES-MS) y dicroísmo circular (DC). Los sistemas liposomales con el péptido microencapsulado fueron obtenidos mediante la formación de una emulsión seguida de la evaporación del solvente orgánico e inversión de fase. Estos sistemas fueron caracterizados en su tamaño, potencial zeta, eficiencia de encapsulación del acetilhexapéptido-3 y se llevó a cabo un estudio preliminar de permeabilidad mediante un ensayo *ex vivo*. Los resultados demostraron que es posible obtener un neuropéptido con bajo número de residuos mediante SFS Fmoc/tBu con alto grado de pureza y buen rendimiento. Por otra parte, el sistema liposomal, conteniendo como ingrediente activo el acetilhexapéptido-3 sintetizado químicamente, tiene potencial para el desarrollo de un novedoso producto cosmeceútico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Resina Rink-amida (0,46 meq/g), Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Glu(OtBu)OH, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y *N,N*-diciohexil carbodiimida (DCC) fueron adquiridos de Aapptec®. 4-metilpiperidina, anhídrido acético, *N,N*-dimetil formamida (DMF), diclorometano (DCM) de Panreac®. Triisopropilsilano (TIS), 1,2-etanoditiol (EDT), ninhidrina, fenol, trifluoroetanol (TFE) de Merck®. Alcohol isopropílico (IPA), cianuro de potasio (KCN), metanol, éter etílico, acetnitrilo (AcN) y ácido trifluoroacético (TFA) de Honeywell Burdick and Jackson. *L*- α -fosfatidilcolina de soya (FoC), colato de sodio (CS), deoxicolato de sodio (DCS) y Tritón X-100 fueron adquiridos de Sigma® y búfer de fosfatos pH=7,4 (PBS) de Lonza®.

Síntesis de acetilhexapéptido-3

El acetilhexapéptido-3 Ac-EEMQRR-NH₂ fue obtenido mediante la metodología SFS, empleando la estrategia Fmoc/tBu [6, 17]. (i) 1 g de resina Rink amida (0,66 meq/g), como soporte sólido, se sometió a un proceso de hinchamiento con DCM mediante agitación constante (AC) a temperatura ambiente (TA). (ii) Seguidamente la resina fue tratada con una solución de 4-metilpiperidina 20 % en DMF para remover el grupo protector Fmoc y dejar el grupo amino disponible para el acople del primer aminoácido de la secuencia. (iii) Para la reacción de acople, se preparó una solución del Fmoc-amino ácido/DCC/HOBt (1/1/1) en DMF y se adicionó a la resina desprotegida. (iv) Luego del acople del primer aminoácido, se llevaron a cabo reacciones sucesivas de remoción del grupo FMOC y de acople para cada uno de los aminoácidos, hasta completar la secuencia deseada. Estas reacciones fueron monitoreadas mediante la prueba de Kaiser [18]. v) Al finalizar el acople de todos los aminoácidos de la secuencia, la resina péptido se trató con solución de desanclaje (TFA/TIS/EDT/H₂O 92,5/2,5/2,5/2,5) a TA y AC. Después de la reacción, la resina se separó mediante filtración y en el filtrado se precipitó el péptido mediante la adición de éter etílico frío. El acetilhexapéptido-3 seco se pesó y almacenó para su posterior caracterización.

Caracterización de acetilhexapéptido-3

El acetilhexapéptido-3 crudo se disolvió en solvente A (H₂O:TFA 0,05%) y se analizó en el cromatógrafo HPLC Agilent series 1260. El sistema cromatográfico empleado fue elución por gradiente de 0 a 70 % de solvente B (ACN:TFA 0,05%) en 45 minutos, empleando una columna Agilent XDB-C18, flujo de 1 mL/minuto y detección a 210 nm. Basados en el resultado RP-HPLC analítica, se diseñó un método para la purificación del péptido mediante extracción en fase sólida (RP-SPE) empleando una columna

Super Clean LC-18 de 5 g. El acetilhexapéptido-3 se disolvió en solvente A, filtró y aplicó a la columna para, posteriormente, realizar su elución por gravedad con fases móviles de diferente polaridad. Cada una de las fracciones colectadas fue analizada por cromatografía RP-HPLC analítica y las fracciones puras fueron sometidas al proceso de liofilización [17]. El producto liofilizado fue analizado mediante ES-MS, utilizando LCMS-IT-TOF (Shimadzu®) con inyección directa para determinar el peso molecular del péptido. ESI ionización positiva con la tensión de detector 1,35 kV y el ionizador tensión [+]=4,50 kV en un intervalo de 100 a 2000 m/z. El análisis por difracción circular (DC) se realizó a TA utilizando un espectro polarímetro Jasco J-810. El acetilhexapéptido-3 fue disuelto en 30% TFE en PBS a una concentración 0,1 mM y el espectro se registró en un rango de longitud de onda de 190 a 260 nm.

Obtención de liposomas

Los sistemas liposomales se obtuvieron basados en el método de formación de una emulsión y posterior evaporación del solvente orgánico para seguidamente inducir la inversión de fases [19]. Brevemente, la FoC se disolvió en 12 mL de éter etílico (fase orgánica, FO), mientras que el agente tensioactivo (CS o DCS) y el acetilhexapéptido-3 sintetizado se disolvieron en 4 mL de PBS (fase acuosa, FW). La FW se dispersó en la FO y se sometió a un proceso de homogenización con ultrasonido (Q-sónica 125) para obtener una emulsión W/O. Este sistema fue sometido a un proceso de evaporación del solvente orgánico empleando un evaporador rotatorio (Buchi® modelo R) hasta la formación de una fase gel. Esta fase fue agitada usando un mezclador de vórtice (IKA® Vortex 3) hasta obtener un sistema fluido, evidencia de la inversión de fases y el solvente orgánico residual se eliminó mediante evaporación rotatoria [20]. Posteriormente, la mitad de los sistemas obtenidos fueron sometidos a un proceso adicional de homogenización mediante ultrasonido y, finalmente, en todos los sistemas se llevó a cabo el aislamiento de los liposomas mediante ultrafiltración, para su caracterización.

Diseño experimental

Con el propósito de simplificar el número de ensayos en esta aproximación, se utilizó el diseño estadístico experimental. Se definieron tres variables independientes (X_1 a X_3) con el propósito de evaluar su influencia en la producción de liposomas con el acetilhexapéptido-3 encapsulado (tabla 1). El nivel de cada variable independiente fue definido con base en lo reportado en la literatura [21-23] y en resultados preliminares obtenidos en el marco del desarrollo de esta investigación. Por otra parte, se definieron tres variables dependientes o respuesta: tamaño promedio de partícula (nm), índice de polidispersidad (IPD) y eficiencia de encapsulación (EE) del neuropéptido. Teniendo en cuenta esto, se realizó un diseño experimental factorial reducido de la forma 2^{P-K} donde $P=3$ y $K=1$ [24, 25], lo que permitió trabajar con cuatro unidades experimentales (UE) y tres

variables independientes en dos niveles. Además de las cuatro UE derivadas del diseño experimental reducido, se incluyó una UE como referencia, en la cual se utilizó el nivel bajo de FoC y no se utilizó agente tensioactivo, como se describe en la tabla 2. De cada una de las cinco UE se realizaron seis réplicas, de las cuales tres de ellas fueron sometidas a un proceso de homogenización final mediante ultrasonido durante 45 segundos.

Tabla 1. Diseño experimental factorial reducido para la obtención de un sistema liposomal con acetilhexapéptido-3 encapsulado.

Variable independiente	Nivel	
	Bajo	Alto
(X ₁) FoC + Tensioactivo (mg)	100	200
(X ₂) Tensioactivo	CS	DCS
(X ₃) Tensioactivo:FoC	1:9	2:8

FoC: L- α -fosfatidilcolina de soya, CS: colato de sodio y DCS: deoxicolato de sodio. En todos los ensayos se mantuvo constante un volumen de 12 mL para FO, 4 mL para FW y 5 mg de péptido sintético disuelto en la FW.

Tabla 2. Unidades experimentales desarrolladas para la encapsulación de acetilhexapéptido-3 en sistemas liposomales obtenidos mediante inversión de fases por evaporación del solvente.

UE	FoC (mg)	CS (mg)	DCS (mg)	FO (mL)	FW (mL)	Péptido (mg)
I	180	20	-	12	4	5
II	80	20	-	12	4	5
III	90	-	10	12	4	5
IV	160	-	40	12	4	5
V	100	-	-	12	4	5

FoC: L- α -fosfatidilcolina de soya, CS: colato de sodio, DCS: deoxicolato de sodio, FO: éter etílico, FW: búfer de fosfatos pH=7,4 (PBS) y péptido: acetilhexapéptido-3. UE I-IV: derivadas del diseño estadístico factorial reducido y UE V: incluida como referencia.

Caracterización de liposomas

El tamaño medio y el potencial zeta de los sistemas liposomales conteniendo el acetilhexapéptido-3 encapsulado fueron determinados por el método de dispersión de luz dinámica utilizando un Zeta Sizer® Nano ZS (Malvern Instruments).

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE), una alícuota de la dispersión liposomal fue dispensada en un sistema Amicon Ultra® 0,5 (MilliporeUltracel-10 kDa). El sistema se centrifugó durante 30 minutos a 14 000 g, el sedimento se lavó con PBS y

centrifugó nuevamente (en las mismas condiciones), el filtrado se reservó para determinar el acetilhexapéptido-3 no encapsulado. Con el propósito de cuantificar el neuropéptido encapsulado, el sedimento fue tratado con una solución de Tritón X-100 2 % bajo agitación a 65 °C durante 10 minutos. Tanto el acetilhexapéptido-3 no encapsulado como el encapsulado fueron determinados mediante RP-HPLC. La EE (%) fue calculada a partir de la relación entre el péptido encapsulado y la cantidad de péptido inicial en el proceso de encapsulación.

Evaluación preliminar *ex vivo* de permeabilidad

Para este estudio se emplearon celdas de Franz, con un área de difusión promedio de $1,62 \pm 0,07 \text{ cm}^2$ y un compartimento receptor $15,5 \pm 0,8 \text{ mL}$. Se utilizó una membrana de 4 cm^2 de superficie proveniente de la parte interna de oreja de cerdo y para la obtención de una membrana integra se siguieron la reglas de la guía OECD [26]. Al compartimento receptor de la celda se adicionó solución PBS y en el compartimento donador se colocó una dispersión del sistema liposomal a evaluar o una solución de acetilhexapéptido-3 en PBS. El sistema se colocó en agitación constante a 400 rpm y a una temperatura de 32 °C durante todo el periodo del ensayo. A intervalos de tiempo establecidos se realizó el muestreo del compartimento receptor, con la correspondiente reposición con PBS fresco. Los ensayos se realizaron por triplicado y la cuantificación de acetilhexapéptido-3 permeado se realizó mediante RP-HPLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos o ingredientes cosmeceúticos tienen la capacidad de proporcionar no solamente beneficios para el cuidado de la piel, sino que pueden presentar potenciales indicaciones farmacéuticas, las cuales dependen de la presencia de un activo natural y de su accesibilidad al blanco terapéutico [27]. En ese contexto, la presente investigación se encaminó, en primera instancia, a la obtención mediante SFS del neuropéptido antiedad acetilhexapéptido-3, cuya secuencia corresponde a Ac-EEMQRR-NH₂. Simultáneamente, se enfocó al diseño y desarrollo de un sistema liposomal con características que permitiera la encapsulación del neuropéptido y de esta forma favorecer su permeación en una membrana modelo para obtener un sistema con potencial uso en el desarrollo de un novedoso producto cosmeceútico. El acetilhexapéptido-3 fue seleccionado para este estudio por su demostrada actividad para minimizar las líneas de expresión y porque ha surgido como una alternativa segura a la toxina botulínica, cuyas limitaciones de uso son conocidas [4, 5].

La síntesis del acetilhexapéptido-3 se llevó a cabo de mediante SFS utilizando la estrategia Fmoc/tBu, esta metodología se constituye en la mejor alternativa para obtener

péptidos sintéticos de bajo peso molecular, con buen rendimiento y un alto grado de pureza. En este proceso, las reacciones de acople y de desprotección de cada uno de los residuos de aminoácidos de la secuencia del neuropéptido fueron asistidas por radiación microondas, aprovechando que el suministro de energía cinética al seno de la reacción es considerado como uno de los mayores avances en la síntesis de péptidos, con el propósito de alcanzar reacciones completas en un menor tiempo. De otra parte, esta condición contribuye a minimizar la agregación de cadenas peptídicas, mejorando considerablemente la calidad del producto de síntesis.

El rendimiento del proceso de síntesis para el péptido crudo fue del 92 %, mientras que para el péptido puro fue cercano al 40 %, se obtuvo un producto con una pureza superior al 90 %, estos resultados se consideran bastante buenos, teniendo en cuenta la cantidad y complejidad de las reacciones que se deben realizar para obtener este tipo de moléculas. En lo que se refiere a la caracterización del acetilhexapéptido-3 mediante RP-HPLC; en el panel a de la figura 1 se observa un perfil cromatográfico con una señal principal (t_R : 8,3 m y 64 % de pureza) para el péptido crudo y algunas señales de menor intensidad y mayor tiempo de retención, probablemente, atribuidas a especies peptídicas en las cuales no fue totalmente retirados los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en la secuencia. En el panel b se observa un perfil cromatográfico con una especie mayoritaria (t_R : 8,2 m y 90 % de pureza), que hizo evidente el eficiente proceso de purificación al que fue sometido el acetilhexapéptido-3 mediante RP-SPE. Esta especie pura fue caracterizada por ES-MS y DC cuyos espectros se reportan en el panel c y d, respectivamente. La señal registrada en el espectro de masas corresponde a $(m+2)/2$, así de esta forma la masa molecular del péptido sintetizado fue de 888,44 daltons, esto es equivalente a la masa calculada teóricamente e indica que el producto de síntesis corresponde a la molécula que se deseaba obtener.

Respecto al análisis por DC del acetilhexapéptido-3, como se observa en el panel d, de acuerdo con los mínimos registrados aproximadamente en 203 nm, 230 nm y un máximo en 197 nm, se sugiere que la secuencia de aminoácidos del neuropéptido sintetizado, a pesar de ser corta, presenta elementos de estructura secundaria característicos de α -hélice, la cual podría estar relacionado con su capacidad para inhibir la formación del complejo SNARE e inhibir la liberación del neurotransmisor acetilcolina y, de esta forma, causar la parálisis temporal en músculo facial minimizando la generación de líneas de expresión. Todos los resultados de la caracterización físicoquímica indican que el neuropéptido fue sintetizado de manera eficiente y con alta pureza, para posteriormente ser utilizado en el estudio de su encapsulación en un sistema liposomal.

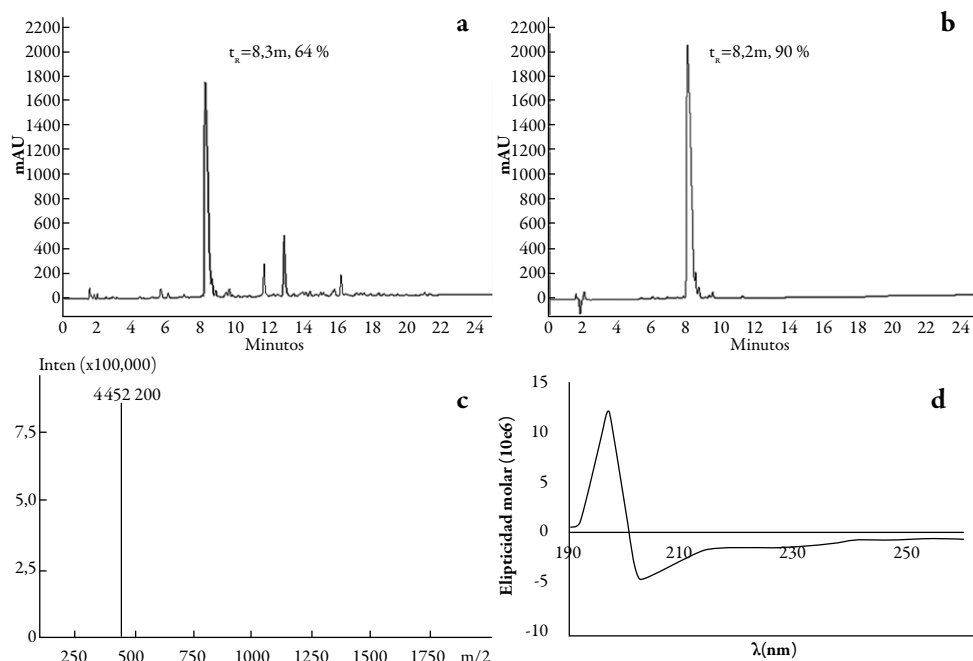


Figura 1. Caracterización de acetilhexapéptido-3. Perfil cromatográfico RP-HPLC a: péptido crudo y b: péptido puro. Espectro de masas ES-MS c: péptido puro y dicroísmo circular DC y d: péptido puro.

Los sistemas liposomales se han empleado como una de las estrategias para superar las limitaciones atribuidas a las propiedades fisicoquímicas de algunos IFA. Los péptidos sintéticos no han sido ajenos a este desarrollo y han sido objeto de numerosos estudios con estos sistemas [28]. Luego de una revisión exhaustiva, para el diseño y desarrollo de los liposomas para la encapsulación del acetilhexapéptido-3, se planteó trabajar con FoC como principal precursor de estos sistemas, ya que es el glicerofosfolípido más estudiado y, probablemente, el más utilizado para ello, además, es considerado el más abundante en la naturaleza. En cuanto a las cantidades de FoC como agente formador del sistema liposomal, está reportado que se debe trabajar con la cantidad necesaria para mantener la emulsión primaria estable durante al menos media hora luego del proceso de homogenización por ultrasonido [19]. En estudios preliminares de nuestro grupo (datos no reportados) se determinó que la cantidad de FoC apropiada para que la primera emulsión (W/O) fuera estable, se encontraba entre 80 y 180 mg en un volumen de 12 mL de éter etílico (FO). Por otra parte, se determinó que el volumen óptimo de FW fue de 4 mL de PBS, en el cual se disolvió completamente el acetilhexapéptido-3 y el agente tensioactivo, de acuerdo con las UE derivadas del diseño experimental. En lo que se refiere CS y DCS, estas son sales biliares denominadas como tensioactivos fisiológicos o “biotensioactivos”

[21] y constituyen uno de los más importantes grupos de adyuvantes estabilizantes en las preparaciones farmacéuticas heterodispersas; por esta razón fueron incluidos en nuestro estudio para la obtención de los sistemas liposomales. Adicionalmente, se ha reportado que la utilización de estos tensioactivos de carácter aniónico asociados con un fosfolípido facilita la permeación o penetración el sistema a través de la piel, ya que se generan los denominados liposomas flexibles [22, 29].

En la tabla 3 se reportan los resultados de la caracterización de los sistemas liposomales obtenidos, se observó que el efecto de las variables independientes sobre cada variable respuesta definida para este estudio dependen de cada una de las formulaciones desarrolladas. En este ensayo se reporta cuatro UE que corresponden a las formulaciones FP1 a FP4, las cuales fueron derivadas del diseño experimental y una UE que corresponde FP5, formulación incluida como de referencia. Las cinco formulaciones denominadas como -0, no fueron sometidas al proceso de homogenización final con ultrasonido, mientras que las formulaciones denominadas -45 fueron sometidas al proceso de homogenización final con ultrasonido durante 45 segundos para evaluar su efecto en el tamaño de los liposomas. Teniendo en cuenta las diez formulaciones desarrolladas, se presentó un rango de tamaño entre 130 ± 10 nm y 670 ± 65 nm, tamaño que permitiría a estos sistemas desplazarse a través de folículos y glándulas, pero con limitación para hacerlo a través de canales intercelulares en el estrato corneo. Al tratarse de liposomas flexibles (UE I-IV), estos podrían deformarse sin alteración de su integridad y pasar a través de un poro con un tamaño cinco veces menor a su tamaño, es decir, si tenemos en cuenta el tamaño inferior de los liposomas obtenidos (130 ± 10 nm), al deformarse podrían pasar a través de un poro de aproximadamente 20 a 30 nm, tamaño que alcanzan los canales intercorneocitos en su máxima capacidad para ensancharse [30, 31].

De otra parte, se observó que IPD en todos los casos fue inferior a $0,56 \pm 0,11$, lo que indica que con la metodología empleada es posible obtener sistemas liposomales con una distribución de tamaño uniforme. De acuerdo con los resultados reportados, se observa que para las formulaciones en las cuales no se realizó el proceso de homogenización final, se presentaron los mayores tamaños de partícula (333 ± 21 nm – 670 ± 65 nm) y los mayores IPD ($0,33 \pm 0,06$ – $0,56 \pm 0,11$), mientras que para las formulaciones con proceso de homogenización final durante 45 segundos se encontraron valores menores tanto para el tamaño (130 ± 10 nm – 213 ± 27 nm) como para el IPD ($0,05 \pm 0,02$ – $0,45 \pm 0,04$). En cuanto a la EE se encontró que estaba en el rango entre $19,1 \pm 5,2$ % y $71,9 \pm 11,5$ % después de evaluar todas las formulaciones desarrolladas y, al igual que las demás variables dependientes, fue afectada por el proceso de homogenización final. En las formulaciones en las que no se realizó el proceso de homogenización final la EE fue mayor ($35,5 \pm 7,0$ % - $71,9 \pm 11,5$ %), esto fue atribuido a que los liposomas obtenidos

fueron de mayor tamaño y como consecuencia de esto presentarían un reservorio con mayor capacidad para encapsular el acetilhexapéptido-3.

Tabla 3. Caracterización de los sistemas liposomales obtenidos mediante inversión de fases por evaporación del solvente. Los resultados se reportan como el promedio \pm SD (n=3).

UE	Formulación	Tamaño (nm)	IPD	EE (%)	P. Zeta (mV)
I	FP1-0	647 \pm 137	0,48 \pm 0,08	71,9 \pm 11,5	ND
	FP1-45	158 \pm 13	0,39 \pm 0,05	45,5 \pm 2,3	-56,1 \pm 1,1
II	FP2-0	670 \pm 65	0,39 \pm 0,02	36,5 \pm 3,8	ND
	FP2-45	130 \pm 10	0,45 \pm 0,04	19,1 \pm 5,2	-60,1 \pm 2,0
III	FP3-0	447 \pm 15	0,56 \pm 0,10	35,5 \pm 7,0	ND
	FP3-45	174 \pm 44	0,32 \pm 0,10	26,0 \pm 7,5	-50,5 \pm 1,4
IV	FP4-0	333 \pm 21	0,33 \pm 0,06	40,8 \pm 6,7	ND
	FP4-45	141 \pm 11	0,05 \pm 0,02	32,5 \pm 7,3	-57,9 \pm 0,7
V	FP5-0	516 \pm 102	0,56 \pm 0,11	58,0 \pm 13,4	ND
	FP5-45	213 \pm 27	0,42 \pm 0,05	46,3 \pm 4,8	-48,1 \pm 1,0

UE: unidad experimental, PDI: índice de polidispersidad, EE: eficiencia de encapsulación y ND: no determinado.

En las formulaciones en las cuales se llevó a cabo proceso de homogenización final se presentó un efecto negativo en todos los casos en la EE (19,1 \pm 5,2 % - 46,3 \pm 4,8 %), probablemente, como consecuencia de la reducción del tamaño y que por efecto del ultrasonido se haya generado una alteración en la integridad de la bicapa liposomal que haya permitido la salida del acetilhexapéptido-3. Ahora analizando específicamente el efecto de FoC como el agente formador en los sistemas obtenidos sin homogenización final, se observó que en la formulación FP1-0 se presentó la mayor EE (71,9 \pm 11,5 %), atribuida no solamente al mayor tamaño de los liposomas, sino a la utilización de la mayor cantidad de FoC (180 mg). Por otra parte, se observó una EE intermedia (58 \pm 13,4 %) en la formulación de FP5-0 en donde se utilizó FoC (100 mg) y una baja EE (36,5 \pm 3,8 %) en la formulación FP2-0 en la cual se utilizó la menor cantidad de FoC (80 mg).

De acuerdo con lo anteriormente descrito, es posible sugerir que la cantidad de FoC como agente formador de los liposomas es directamente proporcional a la EE del acetilhexapéptido-3. Ahora, según los resultados obtenidos de EE para las formulaciones sometidas al proceso de homogenización final y teniendo como referencia FP5-45 (EE 46,3 \pm 4,8 %) se evidenció que la inclusión de moléculas de naturaleza anfifílica y carácter aniónico, como CS o DCS para la formación de liposomas (FP1-45,FP4-45), esto generó una reducción en la EE probablemente debido al efecto del ultrasonido y a las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de estas moléculas con la FoC, ocasionando un desorden

en el autoensamblaje del fosfolípido haciendo que el liposoma formado sea más flexible y probablemente más permeable al péptido encapsulado [21]. Este efecto fue más pronunciado cuando la proporción de agente tensioactivo fue mayor con respecto a la FoC, independiente que se haya utilizado CS o DCS y también se observó en las formulaciones que no fueron sometidas al proceso de homogenización final. Según lo anterior, es importante tener presente que, aunque el propósito de incluir CS o DCS fue generar sistemas liposomales flexibles, que permearan a través de una membrana modelo sin que se viera alterada su integridad, esto ocasionó una reducción en la EE del acetilhexapéptido-3.

Como una prueba adicional, para la caracterización de los sistemas sometidos al proceso de homogenización final, se determinó que todas las formulaciones presentaron un potencial zeta bastante similar de carácter negativo y se encontró en un rango entre $-48,1 \pm 2,4$ mV y $-60,1 \pm 4,1$ mV, atribuido principalmente al fosfolípido formador de los liposomas y al agente tensioactivo aniónico (CS o DCS). La formulación que presentó menor potencial zeta ($-48,1 \pm 1,0$ mV) fue FP5-45, en la cual no fue incluido ningún agente tensioactivo. Este potencial zeta contribuiría a la estabilidad física de la dispersión de los sistemas liposomales, minimizando fenómenos de floculación y la probabilidad de coalescencia de las vesículas [28, 32] y, en el momento de su administración, facilitaría su paso a través de canales hidrofílicos de la piel, pero lo dificultaría a través de los canales lipofílicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos no se evidenció un efecto diferenciador entre utilizar CS o DCS como agente tensioactivo sobre las variables como el tamaño de los liposomas, el IPD y la EE del acetilhexapéptido-3, una formulación utilizando el nivel alto de FoC + tensioactivo (200 mg) y el nivel bajo en la proporción tensioactivo: FoC, es decir, 1:9 permitiría obtener un sistema liposomal flexible con el acetilhexapéptido-3 microencapsulado apropiado para una administración tópica. En el marco de este estudio se encontró que la composición de la formulación FP1-45 (UE I) se ajustó a estos requerimientos, presentando la siguiente caracterización: tamaño promedio de 158 ± 13 nm, IPD de $0,39 \pm 0,05$ y una EE: $45,5 \pm 2,3\%$.

Finalmente, mediante la realización de un ensayo preliminar *ex vivo*, se buscó evaluar la capacidad que tendría uno de los sistemas liposomales flexibles desarrollados en esta aproximación, para permear o penetrar a través de una membrana modelo de acuerdo con lo descrito previamente en el apartado de metodología. El sistema liposomal seleccionado para este ensayo correspondió a la formulación FP1-0 (tamaño: 647 ± 137 nm, IPD: $0,48 \pm 0,08$ y EE: $71,9 \pm 11,5$ %). La razón para seleccionar este sistema fue que presentó la mayor EE del acetilhexapéptido-3 y uno de los mayores tamaños de partícula obtenido en el estudio con una distribución relativamente uniforme. Para el ensayo se utilizó como referencia una solución de acetilhexapéptido-3 en PBS.

En el momento de realizar la cuantificación de acetilhexapéptido-3 en las alícuotas de 1 mL tomadas del sistema liposomal FP1-0 la respuesta fue totalmente nula, es decir, que los resultados sugerían que el sistema FP1-0 no había facilitado la permeación del acetilhexapéptido-3 a través de la membrana modelo al compartimento receptor. Con el propósito de verificar este resultado y contemplando la posibilidad que al tratarse de sistemas liposomales flexibles, estos se hubieran deformado y penetrado a través de la membrana modelo de manera íntegra y manteniendo encapsulado el acetilhexapéptido-3, se realizó un tratamiento a cada una de las alícuotas tomadas con 20 μ L de solución acuosa de tritón X-100 al 6%. El objetivo de este tratamiento, en caso de que se encontraran los liposomas íntegros, fue inducir su disrupción mediante la solubilización del fosfolípido (FoC) con Tritón X-100, permitiendo la liberación del acetilhexapéptido-3 y su posterior cuantificación mediante RP-HPLC. Para mantener condiciones similares en todas las muestras analizadas, este tratamiento se llevó a cabo también a las alícuotas tomadas en el sistema acetilhexapéptido-3 en solución. El análisis cromatográfico se realizó empleando una curva de calibración realizada con el acetilhexapéptido-3 en las mismas condiciones. En la figura 2 se reporta el porcentaje acumulado de acetilhexapéptido-3 que permeó a través de la membrana modelo a partir del sistema liposomal FP1-0 y a partir de una solución acuosa del acetilhexapéptido-3.

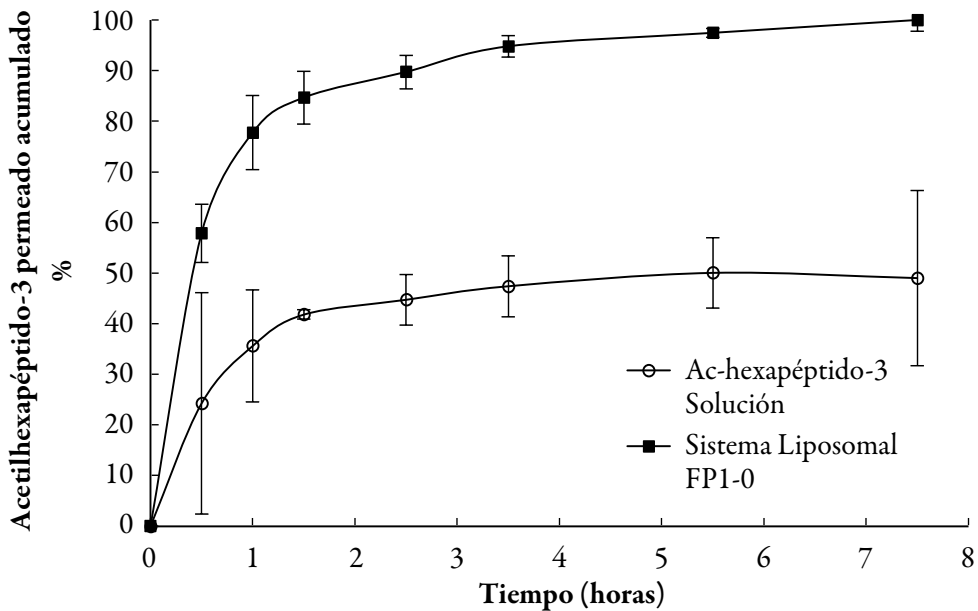


Figura 2. Perfil de permeación de acetilhexapéptido-3 a través de la membrana modelo a partir del sistema liposomal FP1-0, teniendo como referencia una solución acuosa del neuropéptido. Los resultados se reportan como el promedio \pm SD (n=3).

En ambos casos se observó un perfil bifásico, en la primera hora del estudio se presentó una rápida permeación seguida de una fase latente hasta concluir el estudio, la permeación se vio favorecida durante todo el periodo del estudio cuando se utilizó el sistema liposomal FP1-0. Para el sistema FP1-0 la permeación del acetilhexapéptido-3 fue en promedio del 78 % en la primera hora y se alcanzó aproximadamente el 100 % al final concluir el estudio. Para el sistema acetilhexapéptido-3 en solución, su permeación fue prácticamente la mitad, en la primera hora del estudio fue en promedio del 35% y alcanzó el 50% al final del estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo preliminar se puede sugerir que el sistema liposomal FP1-0, a pesar de presentar un tamaño relativamente grande, probablemente por sus características de flexibilidad presentó la capacidad de deformarse y penetrar la membrana modelo sin que se viera alterada su integridad estructural. Esto nos permite sugerir que el sistema FP1-0 alcanzaría de manera íntegra la dermis y allí se produciría la liberación del acetilhexapéptido-3, para inhibir la liberación del neurotransmisor acetilcolina y de esta forma reducir o minimizar las líneas de expresión.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se sintetizó el neuropéptido Ac-EEMQRR-NH₂ mediante SPPS, empleando la estrategia Fmoc/tBu y se obtuvo un producto con buen rendimiento y un alto grado de pureza. El sistema liposomal FP1-45 (UE I) presentó el tamaño de partícula e IPD adecuado y una aceptable EE del Acetilhexapéptido-3, como una contribución para el desarrollo de un novedoso producto cosmecéutico de aplicación tópica.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue desarrollada gracias al soporte financiero otorgado en la Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 2013-2015. Código del proyecto: 19033.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive Peptides: Production and functionality, *Int. Dairy J.*, **16**, 945-960 (2006).
2. J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**(10), 2700-2707 (2018).
3. K. Fields, T.J. Falla, K. Rodan, L. Bush, Bioactive peptides: signaling the future, *J. Cosmet. Dermatol.*, **8**(1), 8-13 (2009).
4. Y. Wang, M. Wang, S. Xiao, P. Pan, P. Li, J. Huo, The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in Chinese subjects: A randomized, placebo-controlled study, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **14**(2), 147-153 (2013).
5. C. Blanes-Mira, J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernández-Ballester, B. Ponsati, *et al.*, A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **24**(5), 303-310 (2002).
6. L.A. Carpino, G.Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5748-5749 (1970).
7. F. Guzman, S. Barberis, A. Illanes, Peptide synthesis: Chemical or enzymatic, *Electr. J. Biotechnol.*, **10**(2), 279-314 (2007).
8. D.J. Craik, D.P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The future of peptide-based drugs, *Chem. Biol. Drug Des.*, **81**(1), 136-147 (2013).
9. M. Cholewinski, B. Luickel, H. Horn, Degradation pathways, analytical characterization and formulation strategies of a peptide and a protein calcitonine and human growth hormone in comparison, *Pharm. Acta Helv.*, **71**(6), 405-419 (1996).
10. D.U. Parkins, U.T. Lashmar, The formulation of biopharmaceutical products, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **3**(4), 129-137 (2000).
11. C. Dai, B. Wang, H. Zhao, Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system, *Colloids Surf. B, Biointerfaces*, **41**(2-3), 117-120 (2005).
12. J.E. Rosas, R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, F. Guzman, M.E. Patarroyo, J.L. Pedraz, Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66, *Vaccine*, **19**, 4445-4451 (2001).

13. L. Jorgensen, E. Moeller, M. Van de Weert, H. Nielsen, S. Frokjaer, Preparing and evaluating delivery systems for proteins, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**(3-4), 174-182 (2006).
14. T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**(1), 36-48 (2013).
15. J. Oliveira-Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J. Palma A. Barcellos, R.J. Lee, J. Maldonado-Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids Surf. B, Biointerfaces*, **123**, 345-363 (2014).
16. V.B. Patravale, S.D. Mandawgade, Novel cosmetic delivery systems: an application update, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**(1), 19-33 (2008).
17. C.F. Vergel-Galeano, Z.J. Rivera-Monroy, J.E. Rosas-Pérez, J.E. García-Castañeda, Efficient synthesis of peptides with 4-methylpiperidine as Fmoc removal reagent by solid phase synthesis, *J. Mex. Chem. Soc.*, **58**(4), 386-392 (2014).
18. E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **34**(2), 595-598 (1970).
19. F. Szoka, Jr., D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **75**(9), 4194-4198 (1978).
20. F. Maestrelli, M.L. González-Rodríguez, A.M. Rabasco, P. Mura, Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery, *Int. J. Pharm.*, **312**(1-2), 53-60 (2006).
21. G. Cevc, Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**(5), 675-711 (2004).
22. A. Gillet, F. Lecomte, P. Hubert, E. Ducat, B. Evrard, G. Piel, Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79**(1), 43-53 (2011).
23. W.S. Zheng, X.Q. Fang, L.L. Wang, Y.J. Zhang, Preparation and quality assessment of itraconazole transfersomes, *Int. J. Pharm.*, **436**(1-2), 291-298 (2012).

24. C. Hinkelmann, O. Kempthorne, *Design and Analysis of Experiments*, 2nd ed., Vol. 1, Wiley, New Jersey (NJ), 2007.
25. R. Kuehl, *Diseño de experimentos*, 2° ed., Thomson Learning, México, 2001.
26. OECD Guideline for the testing of chemicals, *Test N.° 428 Skin Absorption: In vitro Method*, 2004.
27. Z.D. Draelos, The cosmeceutical realm, *Clin. Dermatol.*, **26**(6), 627-632 (2008).
28. P. da Silva Malheiros, Y.M.S. Micheletto, N.P. da Silveira, A. Brandelli, Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin, *Food Res. Int.*, **43**(4), 1198-1203 (2010).
29. P. Ghodeswar, K.R. Gajbhiye, Transdermal delivery of anti-fungal drug using elastic liposomes, *Int. J. Adv. Pharm. Sci.*, **1**(4), 369-374 (2010).
30. G. Cevc, U. Vierl, Nanotechnology and the transdermal route a state of the art review and critical appraisal, *J. Control. Release*, **141**(3), 277-299 (2010).
31. M. Kale, P. Suruse, R. Singh, G. Malhotra, P. Raut, Effect of size reduction techniques on doxorubicin hydrochloride loaded liposomes, *Int. J. Biol. Pharm. Res.*, **3**(3), 308-316 (2012).
32. R.J. Hunter, *Zeta Potential in Colloids Science. Principles and Applications*, 8th ed., Academic Press Inc., London, 1988.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.A. Sandoval, J.E. Rosas, Síntesis en fase sólida de un neuropéptido cosmeceútico y su microencapsulación en un sistema liposomal, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 439-456 (2021).

Official labeled and unlabeled Brazilian honey. Comparison between physicochemical, microbiological, and microscopic parameters

Gabriel S. Silva¹, Vinícius Bernardoni², Rânia M. Santana², Paula Calaça², Débora S. Assis³, William G. Lima¹, Livia C.P. Gardoni², Júlio C.M. Brito^{2*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, Minas Gerais, 35501-293, Brasil. Belo Horizonte, MG, Brasil. *E-mail: juliocmbrito@gmail.com.

³Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

Received: January 27, 2021

Corrected: February 24, 2021

Accepted: February 25, 2021

SUMMARY

Introduction: Honey is a natural substance produced by bees mainly from flower nectar with high nutritional value. However, many commercialized samples are adulterated or falsified. **Method:** We bought twelve honey samples in markets in the city of Betim (Brazil) and analyzed their acidity, pH, electrical conductivity, insoluble matter, ashes, moisture content, presence of mesophile bacteria, molds, yeasts, total coliforms, *Salmonella* spp. and the presence of pollen grains. **Results:** Considering all honey samples, the average pH was 3.8 ± 0.5 and the average free acidity was 29.8 ± 6.6 mEq/kg. Considering acidity, we found the average of lactonic acidity 6.4 ± 2.4 mEq/kg and a total average acidity of 36.2 ± 6.9 mEq/kg. The average moisture content was 19.4 ± 1.0 %, the average electrical conductivity was 391.6 ± 168.6 μ S/cm, the average amount of ashes was 0.5 ± 0.8 % and the average insoluble matter was 0.08 ± 0.02 %. Only the moisture was significantly different between the two groups and ten honey samples had pollen grains. **Conclusions:** The quality parameters of the labeled and unlabeled samples were not significantly different, although two samples of unlabeled honey were fraudulent, mainly due to the absence of pollen grains. Identifying the presence or absence of pollen in the samples is a safe, economical, and reliable first step for verifying the authenticity of the honey.

Keywords: Physical-chemical analysis, microbiological analysis, honey, pollen.

RESUMEN

Miel brasileña oficial etiquetada y no etiquetada. Comparación entre parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y microscópicos

Introducción: la miel es una sustancia natural producida por las abejas, principalmente, a partir del néctar de flores con alto valor nutricional. Sin embargo, muchas muestras comercializadas están adulteradas o falsificadas. **Método:** compramos doce mieles en mercados de la ciudad de Betim (Brasil) y analizamos su acidez, pH, conductividad eléctrica, materia insoluble, cenizas, contenido de humedad, presencia de bacterias mesófilas, mohos, levaduras, coliformes totales, *Salmonella* spp. y la presencia de granos de polen. **Resultados:** considerando todas las muestras de miel, el pH promedio fue de $3,8 \pm 0,5$ y la acidez libre promedio fue de $29,8 \pm 6,6$ mEq/kg. Considerando la acidez, encontramos el promedio de acidez láctica $6,4 \pm 2,4$ mEq/kg y una acidez promedio total de $36,2 \pm 6,9$ mEq/kg. El contenido de humedad promedio fue $19,4 \pm 1,0\%$, la conductividad eléctrica promedio fue $391,6 \pm 168,6$ μ S/cm, la cantidad promedio de cenizas fue $0,5 \pm 0,8\%$ y la materia insoluble promedio fue $0,08 \pm 0,02\%$. Sólo la humedad fue significativamente diferente entre los dos grupos y diez de las muestras de miel tenían granos de polen. **Conclusiones:** los parámetros de calidad de las muestras etiquetadas y no etiquetadas no fueron significativamente diferentes, aunque dos muestras de miel no etiquetadas fueron fraudulentas, debido a la ausencia de granos de polen. Identificar la presencia o ausencia de polen en las muestras es un primer paso seguro, económico y confiable para verificar la autenticidad de la miel.

Palabras clave: Análisis físico-químico, análisis microbiológico, miel, polen.

RESUMO

Mel brasileiro oficialmente rotulado e não rotulado. Comparação entre parâmetros físico-químicos, microbiológicos e microscópicos

Introdução: o mel é uma substância natural produzida pelas abelhas principalmente a partir do néctar da flor com alto valor nutritivo. No entanto, muitas amostras comercializadas são adulteradas ou falsificadas. **Método:** compramos doze méis em mercados da cidade de Betim (Brasil) e analisamos sua acidez, pH, condutividade elétrica, sólidos insolúveis, cinzas, teor de umidade, presença de bactérias mesófilas, bolores, leveduras, coliformes totais, *Salmonella* spp. e a presença de grãos de pólen. **Resultados:** considerando todas as amostras de mel, o pH médio foi de $3,8 \pm 0,5$ e a acidez livre média foi

de $29,8 \pm 6,6$ mEq/kg. Considerando a acidez, encontramos a média de acidez láctica de $6,4 \pm 2,4$ mEq/kg e uma acidez média total de $36,2 \pm 6,9$ mEq/kg. O teor de umidade médio foi de $19,4 \pm 1,0$ %, a condutividade elétrica média foi $391,6 \pm 168,6$ μ S/cm, a quantidade média de cinzas foi $0,5 \pm 0,8$ % e a matéria insolúvel média foi $0,08 \pm 0,02$ %. Apenas a umidade foi significativamente diferente entre os dois grupos e dez das amostras de mel apresentaram grãos de pólen. **Conclusões:** os parâmetros de qualidade das amostras rotuladas e não rotuladas não foram diferentes, embora duas amostras de mel não rotulado fossem fraudulentas, principalmente devido à ausência de grãos de pólen. Identificar a presença ou ausência de pólen nas amostras é um primeiro passo seguro, econômico e confiável para verificar a autenticidade do mel.

Palavras-chaves: Análise físico-química, análise microbiológica, mel, pólen.

INTRODUCTION

Honey is a natural, fluid, and viscous substance, produced by bees from flower nectar and sugary insect excretions [1]. Its main composition is water and monosaccharide (fructose, glucose, and sucrose), which may vary according to the raw material, the geographic region, and the climatic conditions [2]. Honey has a high nutritional value, containing an approximate average of 80 % carbohydrates (in average 35 % glucose, 40 % fructose and 5 % sucrose) and 20 % water [3], among other substances, such as invertase, diastase and glucose oxidase enzymes, amino acids, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), phenolic compounds (cinnamic acids and benzoic acids) and flavonoids (flavanones, flavones and flavanols) [4]. Vitamins and minerals are found in small amounts, as well as organic acids such as acetic and gluconic acid [5-8].

In recent years, with increase in studies conducted with apitherapy, an increase in honey consumption has been observed. Apitherapy (Apis is a Latin word that means bee) is the practice of using bee products such as honey, pollen, propolis, royal jelly, and bee venom for disease prevention or treatment proposes [9]. Regarding the medicinal properties of honey, several activities have been confirmed such as: antibacterial [10], gastrointestinal protector [11], antioxidant [12], healing [13], anti-inflammatory and treatment of burns [5]. For instance, human use of honey to medicinal propositions is traced to some 8000 years ago as depicted by Stone Age paintings. Herein, the ancient Egyptians, Assyrians, Chinese, Greeks, and Romans employed honey for wounds and diseases of the gut [9].

Products that have a high demand in their supply, such as honey, are attractive for adulteration and fraud processes [14, 15]. These, in the case of honey, can occur through the addition of syrups, molasses, starch, water, oils, among other substances that impair

their properties and quality [16]. Once adulterated, the honey may have its physicochemical characteristics altered, such as moisture, weight, density, conductivity, and pH [17]. In addition to these, microbiological contamination can also be verified, which may indicate improper manipulation. Also, the absence of pollen grains in honey sediment can possibly indicate fraud [18]. It is also worth noting that adulteration has a profound impact on the therapeutic properties of honey, thus changing its biological effects and compromising the safety of its use in the context of apitherapy [19].

Honeys without registered official labels and without adequate quality control are more conducive to presenting some sort of adulteration and fraud. The evaluation of the quality of honey required by the Brazilian government, through its physicochemical properties, helps reduce adulteration and frauds since they are extremely important to ensure a good quality of the honeys. For this reason, we have analyzed two groups of honey collected in retail markets, both registered and not registered by the official inspection service, in order to compare and evaluate their quality. Therefore, analysis of the physicochemical, microbiological, and microscopic properties required by Brazilian legislation have been performed.

METHODS

Physicochemical analysis

All samples were bought in the city of Betim, in the Minas Gerais state, Brazil, and were produced by different suppliers. We divided them into two groups: six samples had a label (obtained in supermarkets), and six samples did not have an official label (obtained at popular fairs). The samples were analyzed in triplicate for their physicochemical, microbiological, and microscopic parameters, as follows: The analysis for color determination was fair according to Vidal and Fregosi (1984) [20], in which the samples were previously heated to 40 °C for 30 minutes and then transferred to 10 mm buckets and analyzed using the UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV 1700), at 560 nm, with glycerin solution as white. Subsequently, the color classification was determined from the conversion of the absorbance results using the *Pfund* scale.

Free, lactic and total acidity tests were performed, following AOAC's 962.19 method [21], by potentiometric titration. To determine free acidity, we used standardized solutions of sodium hydroxide 0.05 N (NaOH) and, to determine lactones, we used hydrochloric acid 0.05 N (HCl).

The pH was measured according to AOAC's [21], from a solution containing 10 g of honey, dissolved into 75 mL of Milli-Q water, free of carbon dioxide, using a pHmeter (Digimed).

Electrical conductivity was measured from a solution with 20 % honey (w/v) in a digital conductivity equipment (Mettler Toledo) at 20 °C, following the method of [22].

Moisture content was determined according to AOAC's 969.38B method [21], by refractometry, using a manual refractometer, with the respective temperature correction through the Brix scale (°Bx). The value obtained from °Bx was subtracted from 100 and the moisture value was determined.

The ashes present in the honeys were performed by gravimetric analysis. A clean crucible was taken to the muffle at 550 °C, and then left there for 1 hour, then transferred to a desiccator to cool down and then be weighed. Then, 5 g of honey were transferred to the crucible to be charred in a muffle for 3 hours at 550 °C. Again, the crucible with the charred sample was transferred to a desiccator to cool down and then be weighed. The difference between the weight of the crucible in both moments determined the amount of ash present in the honeys [23].

The determination of insoluble matter was performed by gravimetric analysis. A clean pore 3 sintered crucible (16 to 40 microns) was taken to the greenhouse, at 135 °C, and left there for 1 hour, and then weighed. The honey was diluted into ultrapure water at 80 °C, 25 % m/v, then submitted to a vacuum filtration system, where the sintered crucible was used as a filter element. After being filtered, he was submitted to the greenhouse again, weighed and then the analysts proceeded with the calculations [1, 23, 24].

The Louveaux *et al.* (1978) [25] method was used to evaluate the presence of pollen grains in the samples. 10 g of each sample were weighed and diluted into 20 mL of distilled water. The sets were then centrifuged at 3000 rpm for 7 minutes. The supernatant was discarded, and the sediment was resuspended with distilled water and centrifuged again. Later, the sediment retained at the bottom of the tubes was placed on a histological slide and fixed by heating at 35 °C. Subsequently, two drops of liquid glycerin and gelatin [26] were added and the coverslip was applied, leaving the slides to dry for 24 hours. Qualitative analysis was performed under an optical microscope (Olympus BX50) and the photomicrographs were taken using the Image-Pro software (version 10) and the Motic 3.0MP camera.

Microbiological trials

The microbiological analysis performed were count of mesophile bacteria, presence of molds and yeasts, total coliforms, *Salmonella* spp. and their biochemical identification, all according to the analytical methods of the Normative Instruction SDA - 62, of 08/26/2003 [27]. From the data obtained by colony count, the number of microorganisms present in the sample under analysis was calculated for each analysis and the result expressed in colony forming unit per gram (CFU/g).

Statistical analysis

We calculated the mean and standard deviation for the physicochemical and microbiological parameters of both the labeled and unlabeled honey samples. We performed the normality test for all quantitative physicochemical and microbiological variables using the *Shapiro-Wilk* test. Then, we checked if there were significant differences between the labelled and unlabeled honey samples, using the *T test* to normally distribute variables and the *Mann-Whitney* test for the other variables. The significance level used in the tests was 5%. The analysis was performed in the R software, version 4.0.0 [28].

RESULTS

Physicochemical parameters of honey

The main results obtained through the physicochemical analysis of the twelve honey samples are expressed in table 1. Of all physicochemical analysis performed, only moisture content showed significant difference between the two groups ($p < 0.05$) (figure 1).

Table 1. Physicochemical results of official labelled and not samples of honey.

Sample	pH	Free acidity	Lactonic acidity	Total acidity	Moisture content	Conductivity	Ashes	Insoluble solids
1072	2.7967	38.3427	3.4361	41.7788	19.47	208.70	0.4	0.082
1073	3.0867	23.3737	4.1346	27.5083	16.53	162.00	0.59*	0.065
1074	4.2867	21.1189	1.6395	22.7584	19.27	480.83	0.02	0.078
1075	4.2000	27.3545	9.0889	36.4434	19.93	644.93	0.05	0.072
1076	4.0133	38.2509	5.7614	44.0123	20.47*	451.13	0.96*	0.07
1077	3.8733	26.1837	7.2560	33.4398	19.67	250.30	3.05*	0.088
1078	3.7867	30.2126	8.0925	38.3086	20.67*	242.37	0.26	0.08
1079	4.1467	34.0353	5.7779	39.8132	19,80	501.90	0,01	0.068
1080	4,2767	23,6548	8,0983	31,7441	19.67	461.43	0.27	0.072
1081	4.2933	26.8427	9.7383	36.5820	19.53	645.07	0.11	0.162*
1082	4.0500	26.7685	7.5729	34.3414	18.87	422.23	0.3	0.137*
1083	3.1033	41.4645	6.2613	47.7258	19.40	228.83	0.31	0.087

Subtitle: Free, lactonic and total acidity values were expressed by milliequivalent per kilo (mEq/kg); conductivity by microsiemens per centimeter ($\mu\text{S}/\text{cm}$); moisture content, ashes, and insoluble solids by percent (%); * values above the quality standard (AOAC, 1999); SD: standard deviation; IL: inferior limit; UL: upper limit.

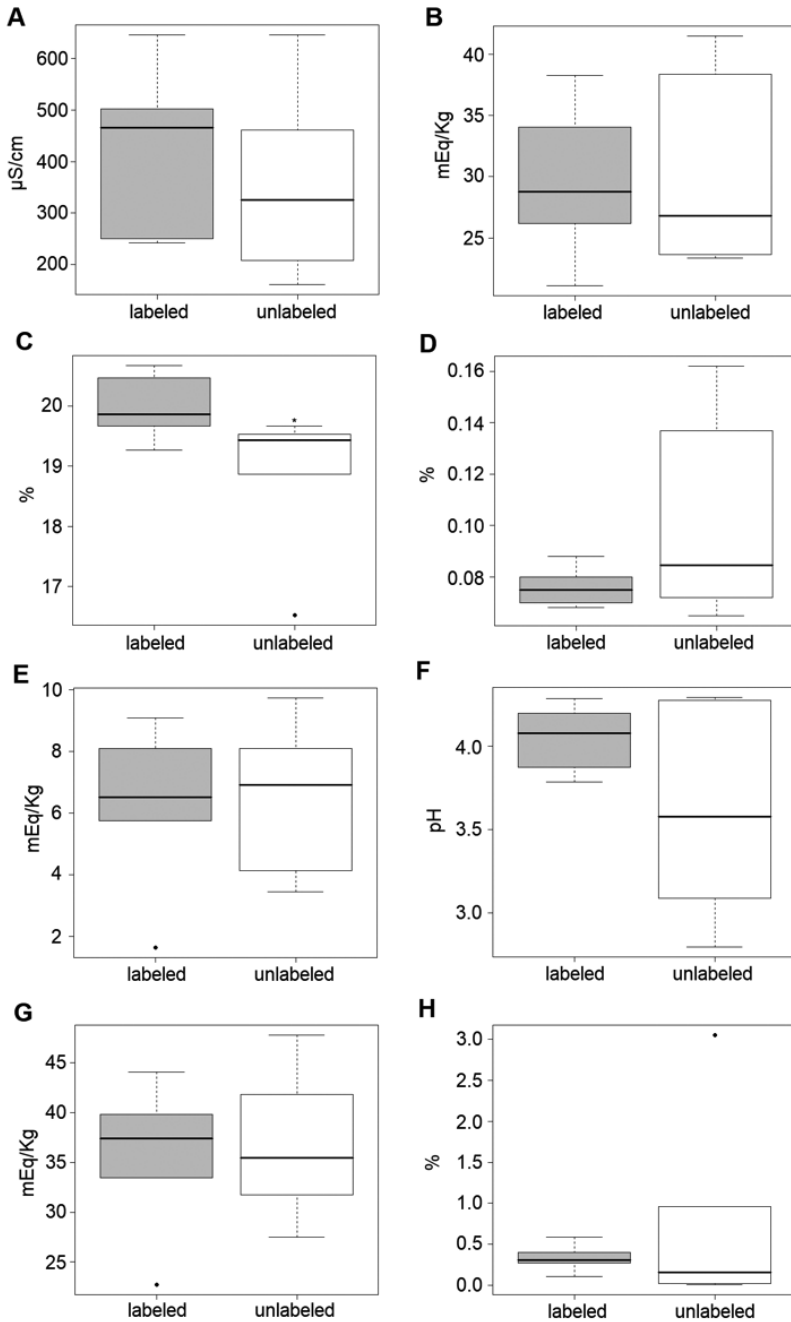


Figure 1. Boxplot representing the data of each physical chemical analysis performed. A: conductivity; B: free acidity; C: moisture content; D: water insoluble solids; E: lactic acid; F: pH; G: total acidity; H: ashes. * $p < 0.05$.

Color analysis

During the collection of the honey samples, a significant difference in their color was observed. Through spectrophotometry, it was possible to classify the honey samples according to their color. The predominant color of the honey samples analyzed was light amber (60%), and the official labeled samples ranged from light amber to dark amber, while the unlabeled samples ranged from without color (0.9323 ± 0.059) to light amber.

Free, total and lactonic acidity and pH analysis

As example values for quality standards, the values obtained for total acidity (figure 1G) ranged from 22.76 mEq/kg to 47.73 mEq/kg, with an average of 36.2 ± 6.94 mEq/kg, when compared to the values established by the AOAC (< 50.0 mEq/kg). This applied to all the samples. The unlabeled honeys presented a mean total acidity of 36.61 ± 7.23 mEq/kg (ranging from 27.50 ± 0.71 to 47.72 ± 1.26 mEq/kg) and the official labeled showed an average of 35.79 ± 7.29 mEq/kg (ranging from 22.75 ± 1.32 to 44.01 ± 0.71 mEq/kg), which means no significant difference was found between the groups ($p > 0.05$).

The average lactonic acidity (figure 1E) was 6.4 ± 2.41 mEq/kg (1.64 to 9.74 mEq/kg), while the free mean acidity (figure 1B) was 29.8 ± 16.67 mEq/kg (21.12 to 41.46 mEq/kg), with no significant difference ($p > 0.05$) between groups either. The results found in the pH (figure 1F) analysis showed no significant difference between the groups ($p > 0.05$), with their values ranging between 2.79 ± 0.01 and 4.28 ± 0.01 , with an average of 3.83 ± 0.53 .

Electrical conductivity and moisture analysis

The electrical conductivity (figure 1A) analysis of the twelve samples presented an average of 391.64 ± 168.63 $\mu\text{S}/\text{cm}$, with variation between 162.00 and 645.07 $\mu\text{S}/\text{cm}$, with no significant difference between the groups ($p > 0.05$), and the moisture content (figure 1C) results ranged from 16.53 ± 0.31 % to 20.67 ± 0.12 % with an average of 19.44 ± 1.03 %.

The unlabeled samples presented an average moisture content of 18.91 ± 1.19 % (16.53 to 19.67 %) and the official labeled, 19.99 ± 0.47 % (19.27 to 20.67 %). Therefore, the groups showed a significant difference between them ($p < 0.05$).

Insoluble solids and ash analysis

The mean found in the analysis of insoluble solids (figure 1D) was 0.0884 ± 0.0299 % (0.0650 ± 0.0150 % to 0.1620 ± 0.010 %), with no significant difference between

groups ($p > 0.05$). The unlabeled samples had as average insoluble solids content $0.1010 \pm 0.0390\%$ (from $0.0650 \pm 0.0150\%$ to $0.1620 \pm 0.010\%$), whereas for the samples with an official labeled, the mean content was $0.0760 \pm 0.0080\%$ (from 0.0680 ± 0.0060 to $0.0880 \pm 0.0170\%$).

Like insoluble solids, the mean found in the ash analysis (figure 1H) showed a great variation between its results, with an average of $0.52 \pm 0.83\%$. The unlabeled samples had an average of $0.72 \pm 1.19\%$, while the official labeled samples average was $0.33 \pm 0.15\%$. However, no significant difference was observed between the groups ($p > 0.05$).

Microbiological analysis

For the microbiological analysis, the presence of *Salmonella* spp. was not detected and mold and yeast counts were $< 1.0 \times 10^2$ CFU, according to table 2.

Table 2. Microbiological result of official labeled and not samples of honey.

Samples	Coliforms (MLN/g)	Molds and yeasts (CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp. (CFU/mL)	Mesophiles
1072	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1073	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1074	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1075	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1076	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1077	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1078	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1079	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1080	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1081	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1082	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2
1083	< 3.0	< 1.0×10^2	Negative	< 1.0×10^2

CFU/g: colony forming unit per gram; CFU/mL: colony forming unit per milliliter; MLN/g: most likely number per gram.

Pollen spectra of honey

Of the twelve samples analyzed, only two did not present pollen grains in their constitution (figure 2). Four samples showed a predominance of the *Eucalyptus* pollen type (Myrtaceae). One sample, besides having a large number of grains also of the *Eucalyptus* type, presented numerous grains of Malvaceae family. Pollen grains of the Mimosa type were predominant in one sample. Two samples showed a great diversity of pollen

grains and the presence of a grainy mass, but without a predominance of a single pollen type. In two samples there were many plant fragments, and a few pollen grains were observed, although these grains belonged to several botanical families.

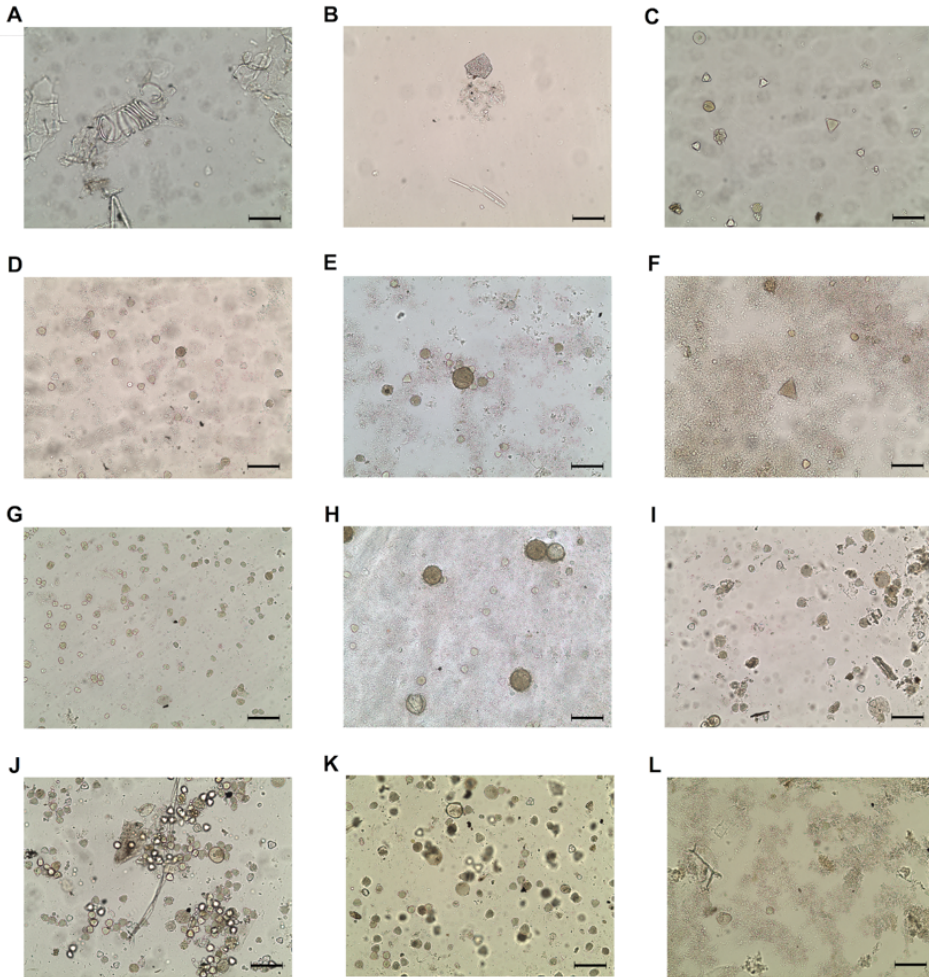


Figure 2. Optical microscopy photomicrographs of pollen grains present in honey samples from the Betim region, MG, with an optical magnification of 200x. A: 1072 sample without pollen; B: 1073 sample without pollen; C: 1074 sample with *Eucalyptus* (Myrtaceae) pollen; D: 1075 sample with *Eucalyptus* (Myrtaceae) pollen; E: 1076 sample with great diversity of pollen grains and presence of granular mass, without, however, predominating a single pollen type; F: 1077 sample without predominating a single pollen type; G: 1078 sample with Fabaceae (*Mimosa*) pollen; H: 1079 sample with family Myrtaceae and Malvaceae pollen; I: 1080 sample without predominating a single pollen type; J: 1081 sample with *Eucalyptus* (Myrtaceae) pollen; K: 1082 sample with *Eucalyptus* (Myrtaceae) pollen; L: 1083 sample without predominating a single pollen type.

DISCUSSION

Our study shows that the official labeled honeys met the requirements of the current legislation, while some unlabeled samples did not. Each kind of honey has distinct physicochemical and microscopic characteristics, which may explain the variability of these parameters between the labeled and unlabeled groups. Regarding microbiological contamination, no sample was outside the established limits, which demonstrates the safety in terms of the presence of bacteria and fungi in these honey samples from Betim, MG.

PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF HONEY

The evaluation of honey quality is important because its quality can be affected by several factors such as: heating, liquefaction, clarification, or aging. Still, even with the mandatory implementation of these analyses, it is possible to find adulteration and fraud in honey. These quality-related analyses should be performed to promote a genuineness and quality of the product to the consumer, emphasizing the importance of product standardization to avoid fraud and tampering.

Currently, the required analyses are reducing sugars, moisture, apparent sucrose, insoluble matter, minerals, acidity, diastase activity and hydroxymethylfufural, in order to standardize and ensure the quality of honey [1, 23].

Honey coloration is associated with its floral origin, storage conditions such as time, light, temperature and moisture content, minerals, and honey ripening in the hive [29]. Due to this sensory characteristic of honey, color has a great influence in the choice of honey by the consumer [30, 31]. Those with dark color have higher ash contents, while the light ones have levels below 0.1% [32].

As well as coloration, acidity did not present significantly different values between the groups. It is determined by organic acids originated from different sources of nectar that determine the acidity of honey during its maturation process [33]. Thus, honey acidity is a component that contributes to the maintenance of its stability, reducing the development of microorganisms, which are consistent with the findings of microbiological analysis, since all samples presented values within the normality for acidity.

On the other hand, just like, the Brazilian legislation does not require the evaluation of honey pH as a mandatory analysis, so there is no pre-established pH range [23]. The pH values differ from the floristic composition used as raw material for its production, since the pH of honey is influenced by the pH of nectar and varies according to

the hydrogen ions dissolved in water, as well as its acidity, besides containing a varied number of organic acids and amino acids in its composition, conferring its acid character. However, it was observed that three unlabeled samples presented abnormal pH values, compared to other studies that had pH ranging from 3.68 to 4.97 [34] and 3.60 to 5.35 [35].

Conductivity is recognized by some authors as an important proof of the botanical origin of honey [24, 36, 37]. However, to compose the international standards of honey quality, a maximum limit of 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ of conductivity was established [24]. Based on this parameter, both groups presented values within the standard, but without significant difference between them. In addition, a great variation in honey conductivity was observed, probably due to different concentrations of organic acids, minerals, proteins, and other substances that compose it. Another study reinforces this variation, in which 57 samples of different honeys were analyzed, presenting a variation of 100 to 2103 $\mu\text{S}/\text{cm}$ depending on the region of Brazil from which they were collected [38].

On the other hand, the analysis of the contents of insoluble matter in water revealed that two of the unlabeled samples analyzed were outside the standard established by the AOAC: a maximum content of 0.1 %. The number of insoluble solids in water varies mainly according to the hygienic character during honey production [39] and its evaluation allows to establish a honey purity index [40].

We know that the ash concentration of a honey sample should not exceed 0.5 %. From this point, our results show three samples, one unlabeled and two official labeled, expressed results above the reference value. The ashes directly express the amount of minerals present in honey, which can be influenced by factors such as bee, beekeeper management of the hives, climate, soil, and botanical origin [41].

Regarding the moisture analysis of honeys, the significant difference found between the groups can be explained by the poor storage and conditioning conditions of the unlabeled honey, which was in reused bottles (glass bottles of beer, pepper) and some were sealed by corks, which reduces their low level of moisture content in relation to the official labeled samples, since the pores present in the stoppers allow water to pass through them. Two official labeled samples had values above the allowed by the Brazilian legislation, which establishes a maximum limit of 20 % for all types of honey. The moisture content of a honey varies according to the rate of dehydration of nectar during its transformation process, raw material used for its production, climate, and harvest time [42].

However, both groups of honey produced satisfactory effects, indicating that their collection was performed at the correct time, since, when collected early, the moisture

content values tend to be above 20 % due to low dehydration during their transformation process [43]. Moreover, this low moisture content value contributes to a reduction in microbiological contamination of the samples [44], which was verified through microbiological tests counting mesophyll bacteria, presence of molds and yeasts, total coliforms of thermolabile and *Salmonella* spp.

Microbiological analysis of honey

In microbiological analysis, negative or non-significant results were observed in all samples (mesophile bacteria, presence of molds and yeasts, total coliforms of thermolabile, *Salmonella* spp.). The absence of microorganisms in the samples of both groups can be explained, in addition to the care in the packaging and added to this, by the low moisture content of the samples, since the water present in honey has a strong interaction with sugars; there is a decrease in water activity reducing its availability to microorganisms [45]. Another factor that contributes to the absence of microorganisms is the acidity of honey, which, due to the presence of hydrogen ions (low pH), maintains its chemical stability, inhibiting the growth of microorganisms [45]. Other factors, in addition to osmotic pressure and pH, also contribute to the low microbial contamination in honey such as presence of hydrogen peroxide, bee-defensin-1 peptide, and phenolic compounds [46].

Pollen spectra of honey

The presence of pollen indicates the type of honey, and its absence is a strong indication of adulteration. This was identified in two samples without pollen (figure 2), and these also had the lowest pH values (table 2), with one pH below 3. However, there was no distinction with the other results, both physical-chemical and microbiological. Which indicates how important it is to carry out all physical-chemical, microscopic, and microbiological analyzes in the search for the quality and authenticity of honeys.

CONCLUSION

We conclude that the physicochemical methods, combined with the microbiological and microscopic methods were sufficient to define the adulterated and falsified honeys. In addition, our results show the importance of official labels to guarantee the quality of marketed honey and to bring safety and protection to this product, since no labelled honey was adulterated. Finally, we conclude that identifying the presence or absence of pollen in the samples is a safe and reliable way to verify the authenticity of honey.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) for their support and Fabian Méndez librarianship student at UFMG for Spanish correction. V.B. is grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) for scholarship.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Funding: There was no financing in any agency. There was no funding from any agency to conduct this project. Scholarship was provided by Fapemig.

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

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animal studies.

Author contributions: G.S.S. and J.C.M.B. acted in the planning and conduct of the study, carried out the experiments, statistical treatment of data drafting of this article. V.B., R.M.S. and D.S.A. acted in the planning and conduct of the study, carried out the experiments, P.S.S.T., W.G.L and L.C.P.G contributed to the drafting and correction of the work.

REFERENCES

1. Codex Alimentarius Commission, 1981, *Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981 (Codex Standard)*, rev. 1: 1987, rev. 2: 2001, 7 p. URL: <https://ihc-platform.net/codex2001.pdf>
2. S. Ajlouni, P. Sujirapinyokul, Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey, *Food Chemistry*, **119**(3), 1000-1005 (2010). DOI:10.1016/j.foodchem.2009.07.057
3. H.I. Aljohar, H.M. Maher, J. Albaqami, M. Al-Mehaizie, R. Orfali, S. Alrubia, Physical and chemical screening of honey samples available in the Saudi market: An important aspect in the authentication process and quality assessment, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**(7), 932-942 (2018). DOI:10.1016/j.jsps.2018.04.013

4. O.G. Rodríguez, F.B. Sulbarán, A. Ferrer, B. Rodríguez, Characterization of honey produced in Venezuela, *Food Chemistry*, **84**(4), 499-502 (2004). DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00517-4
5. K.P. Sampath-Kumar, D. Bhowmik, Chiranjib, Biswajit, M.R. Chandira, Medicinal uses and health benefits of Honey: An Overview, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2**(1), 385-395 (2010).
6. I.C.R.F. Ferreira, E. Aires, J.C.M. Barreira, L.M. Estevinho, Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistry*, **114**(4), 1438-1443 (2009). DOI :10.1016/j.foodchem.2008.11.028
7. A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, O.G. Nacoulma, Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, **91**(3), 571-577 (2005). DOI:10.1016/j.foodchem.2004.10.006
8. I.K. Karabagias, E. Dimitriou, S. Kontakos, M.G. Kontominas, Phenolic profile, colour intensity, and radical scavenging activity of Greek unifloral honeys, *European Food Research and Technology*, **242**, 1201-1210 (2016). DOI:10.1007/s00217-015-2624-6
9. S. Samarghandian, T. Farkhondeh, F. Samini, Honey and health: A review of recent clinical research, *Pharmacognosy Research*, **9**(2), 121-127 (2017). DOI:10.4103/0974-8490.204647
10. K.L. Allen, P.C. Molan, G.M. Reid, A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **43**(12), 817-822 (1991). DOI:10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x
11. S.D. Ladas, D.N. Haritos, S.A. Raptis, Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption, *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**(6), 1212-1215 (1995). DOI:10.1093/ajcn/62.6.1212
12. S.Z. Hussein, K.M. Yusoff, S. Makpol, Y.A.M. Yusof, Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey, *Molecules*, **16**(8), 6378-6395 (2011). DOI:10.3390/molecules16066378
13. M. Subrahmanyam, Topical application of honey in treatment of burns, *British Journal of Surgery*, **78**(4), 497-498 (1991). DOI:10.1002/bjs.1800780435

14. S. Bogdanov, *Harmonised Methods of the Honey Commission*, Swiss Bee Research Centre, Bern, Switzerland, 2002, 62 p. URL : http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods_e.pdf
15. B.A. Souza, L.C. Marchini, C.T.S. Dias, M. Oda-Souza, C.A.L. Carvalho, R.M.O. Alves, Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**(4), 798-802 (2009). DOI:10.1590/s0101-20612009000400015
16. N.M. El-Bialec, M.A. Sorour, Effect of adulteration on honey properties, *International Journal of Applied Science and Technology*, **1**(6), 122-132 (2011).
17. S. Ur-Rehman, Z.F. Khan, T. Maqbool, Physical and spectroscopic characterization of Pakistani honey, *Ciencia e Investigación Agraria*, **35**(2), 199-204 (2008). DOI:10.4067/S0718-16202008000200009
18. O.M. Barth, Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees, *Scientia Agrícola*, **61**(3), 342-350 (2004). DOI:10.1590/S0103-90162004000300018
19. S.A. Meo, S.A. Al-Asiri, A.L. Mahesar, M.J. Ansari, Role of honey in modern medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **24**(5), 975-978 (2017). DOI:10.1016/j.sjbs.2016.12.010
20. R. Vidal, E.V. Fregosi, *Mel: Características, análises físico-químicas, adulterações e transformações*, Barretos: Instituto Tecnológico Científico "Roberto Rios", 1984, 95 p.
21. *Official methods of analysis of AOAC International*, 16th ed., Choice Reviews Online, 1997. DOI:10.5860/choice.35-0912
22. R.B. Baird, A.D. Eaton, E.W. Rice, L.S. Clesceri, *Standard Methods: for the examination of water and wastewater*, 23rd ed., American Public Health Association: The Gold Standard for Over 100 Years, 2017.
23. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa 11, *Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel*, 20 de outubro de 2000.
24. S. Bogdanov, C. Lüllmann, P. Martin, W. von der Ohe, H. Russmann, G. Vorwohl, *et al.*, *Bee World*, **80**(2), 61-69 (1999). DOI:10.1080/0005772x.1999.11099428

25. J. Louveaux, A. Maurizio, G. Vorwohl, Commission internationale de botanique apicole de L'U.I.S.B.: Les méthodes de la mélikso-palynologie, *Apidologie*, **1**(2), 211-227 (1970). DOI:10.1051/apido:19700206
26. G. Erdtman, Pollen morphology and plant taxonomy, *Geologiska Föreningen i Stockholm Förhandlingar*, **74**(4), 526-527 (1952). DOI:10.1080/11035895209453507
27. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução normativa n.º 62, *Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*, 26 de agosto de 2003.
28. R Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria, 2017.
29. J.J.J. Lacerda, J.S. Santos, S.A. Santos, G.B. Rodrigues, M.L.P. Santos, Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada, *Química Nova*, **33**(5), 1022-1026 (2010). DOI:10.1590/S0100-40422010000500003
30. D. Anupama, K.K. Bhat, V.K. Sapna, Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey, *Food Research International*, **36**(2), 183-191 (2003). DOI:10.1016/S0963-9969(02)00135-7
31. F.A. Arnaud, R.A. da Silva, L.L.S. Araújo, R.J. Santos. Jr., D.A. Oliveira, Jr., Perfil sensorial de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) produzidos na microrregião de Catolé do Rocha-PB, *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, **3**(4), 73-85 (2008).
32. S. Gomes, L.G. Dias, L.L. Moreira, P. Rodrigues, L. Estevinho, Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal, *Food and Chemical Toxicology*, **48**(2), 544-548 (2010). DOI:10.1016/j.fct.2009.11.029
33. M.S. Finola, M.C. Lasagno, J.M. Marioli, Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina, *Food Chemistry*, **100**(4), 1649-1653 (2007). DOI:10.1016/j.foodchem.2005.12.046
34. H. Arida, R. Hassan, A. El-Naggar, Quality assessment of honey using modern analytical tools, *Analytical Letters*, **45**(11), 1526-1536 (2012). DOI:10.1080/0032719.2012.675492

35. D.M. Borsato, T. Vargas, L. Koop, P.V. Farago, M.M. Almeida, Physicochemical quality control of bee honeys from Campos Gerais Region of Paraná – Brazil, *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba*, **28**(2), 205-212 (2010). DOI:10.5380/cep.v28i2.20402
36. S. Serrano, M. Villarejo, R. Espejo, M. Jodral, Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis, *Food Chemistry*, **87**(4), 619-625 (2004). DOI:10.1016/j.foodchem.2004.01.031
37. C. Acquarone, P. Buera, B. Elizalde, Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys, *Food Chemistry*, **101**(2), 695-703 (2007). DOI:10.1016/j.foodchem.2006.01.058
38. H. Horn, J.E.T. Durán, M. Cortopassi-Laurino, M.R.C. Issa, V.A.A. de Toledo, E. Bastos, A.E.E. Soares, *Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palmitológicas*, in: XI Congresso Brasileiro de Apicultura, Teresina, Brazil, 1996, p. 403-429.
39. J.E. Welke, S. Reginatto, D. Ferreira, R. Vicenzi, J.M. Soares, Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, *Ciência Rural*, **38**(6), 1737-1741 (2008). DOI:10.1590/s0103-84782008000600038
40. M.E.M. Gomez, E.G. Hernandez, J.Y.M. Gomez, J.L.M. Marin, Physicochemical analysis of Spanish commercial Eucalyptus honeys, *Journal of Apicultural Research*, **32**(3-4), 121-126 (1993). DOI:10.1080/00218839.1993.11101296
41. L.C. Marchini, A.C.C.C. Moreti, I.P. Otsuk, Cluster analysis, with basis in physico-chemical composition, of samples of honey produced by *Apis mellifera* L. in São Paulo State, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **25**(1), 8-17 (2005). DOI:10.1590/s0101-20612005000100003
42. R.M.O. Alves, C.A.L. Carvalho, B.A. Souza, G.S. Sodré, L.C. Marchini, Physicochemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae), *Food Science and Technology*, **25**(4), 644-650 (2005). DOI:10.1590/s0101-20612005000400004
43. B.A.D. Menezes, R.A. Mattietto, L.F.H. Lourenço, Evaluation of quality of honey from africanized and stingless bee natives of the northeast of the state

- of Pará, *Ciência Animal Brasileira*, **19**, 1-13 (2018). DOI:10.1590/1809-6891v19e-46578
44. H. Abramovic, M. Jamnik, L. Burkan, M. Kac, Water activity and water content in Slovenian honeys, *Food Control*, **19**(11), 1086-1090 (2008). DOI:10.1016/j.foodcont.2007.11.008
45. C.A. Holanda, A.R. Oliveira, M.C.P. Costa, M.N.S. Ribeiro, J.L. Souza, M.J.A.M. Araújo, Quality of honey produced by *Meipona fasciculata* Smith of cerrado region from Maranhão state, Brazil, *Quimica Nova*, **35**(1), 55-58 (2012). DOI:10.1590/S0100-40422012000100011
46. P.H.S. Kwakman, S.A.J. Zaat. Antibacterial components of honey, *IUBMB Life*, **65**(1), 48-55 (2012). DOI:10.1002/iub.578

HOW TO CITE THIS ARTICLE

G.S. Silva, V. Bernardoni, R.M. Santana, P.S.S.T. Calaça, D.S. Assis, W.G. Lima, L.C.P. Gardoni, J.C.M. Brito, Official labeled and unlabeled Brazilian honey. Comparison between physicochemical, microbiological, and microscopic parameters, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 457-475 (2021).

Regulación de la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos en España: riesgos y ventajas en situaciones excepcionales

Silvia Enríquez-Fernández

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, (Unidad Docente de Historia y Legislación Farmacéutica), Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, España.

Correo electrónico: silvienr@ucm.es

Recibido: 12 de febrero de 2021

Revisado: 2 de marzo de 2021

Aceptado: 4 de marzo de 2021

RESUMEN

Objetivo: analizar la regulación de la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos en España, así como los riesgos y ventajas que esta presenta. **Metodología:** se analizó e interpretó la legislación en materia de regulación de venta de medicamentos de uso humano a través de Internet en el ordenamiento jurídico español. **Resultados:** dicha regulación se encuentra en el Real Decreto 870/2013, de 8 de noviembre, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica. Este Real Decreto limita la venta de medicamentos a través de Internet a aquellos que no requieran prescripción médica, ya que en Internet se pueden vender medicamentos ilegalmente, lo cual supone una amenaza para la salud pública. No obstante, también existen ventajas de dicha actividad como es la garantía de acceso a los medicamentos por parte de la población. En la presente contribución se analiza el caso de las nuevas condiciones de dispensación establecidas durante la pandemia provocada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2. **Conclusiones:** para garantizar la seguridad de los pacientes se limita la venta de medicamentos vía online, no obstante, en situaciones especiales, como la crisis sanitaria generada por el nuevo coronavirus se amplió el marco normativo para garantizar el acceso de la población a los medicamentos.

Palabras clave: Medicamentos, Internet, medicamentos falsificados, coronavirus.

SUMMARY

Regulation of the sale of medicines for human use through telematic procedures in Spain

Aim: to analyze the regulation of the sale of medicines by telematic procedures in Spain, as well as the risks and advantages that it presents. **Methodology:** the legislation on the regulation of the sale of medicines for human use through the Internet in the Spanish legal system was analysed and interpreted. **Results:** said regulation is found in Royal Decree 870/2013, of November 8, which regulates the distance sale to the public, through websites, of medicines for human use not subject to medical prescription. This Royal Decree limits the sale of medicines through the Internet to those that do not require a medical prescription, since medicines can be sold illegally on the Internet, which poses a threat to public health. However, there are also advantages of this activity, such as the guarantee of access to medicines by the population. This contribution analyses the case of the new dispensing conditions established during the pandemic caused by the new SARS-CoV-2 coronavirus. **Conclusions:** to guarantee the safety of patients, the sale of medicines online is limited, however, in special situations, such as the health crisis generated by the new coronavirus, the regulatory framework was expanded to guarantee the population's access to medicines.

Key words: Medications, Internet, Counterfeit Drugs, coronavirus.

RESUMO

Regulamentação da venda de medicamentos por procedimentos telemáticos em Espanha: riscos e vantagens em situações excepcionais

Objetivo: analisar a regulamentação da comercialização de medicamentos por procedimentos telemáticos em Espanha, bem como os riscos e vantagens que apresenta. **Metodologia:** a legislação foi analisada e interpretada sobre a regulamentação da comercialização de medicamentos de uso humano pela Internet no ordenamento jurídico espanhol. **Resultados:** o referido regulamento consta do Real Decreto 870/2013, de 8 de novembro, que regulamenta a venda à distância ao público, através de websites, de medicamentos para uso humano não sujeitos a receita médica. Este Decreto Real limita a venda de medicamentos pela Internet

aos que não necessitem de receita médica, uma vez que os medicamentos podem ser comercializados ilegalmente na Internet, o que representa uma ameaça para a saúde pública. Porém, também há vantagens dessa atividade, como a garantia de acesso a medicamentos por parte da população. Esta contribuição analisa o caso das novas condições de dispensação estabelecidas durante a pandemia causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. **Conclusões:** para garantir a segurança dos pacientes, a venda de medicamentos online é limitada, porém, em situações especiais, como a crise de saúde gerada pelo novo coronavírus, o marco regulatório foi ampliado para garantir o acesso da população aos medicamentos.

Palavras-chave: Medicamentos, Internet, medicamentos falsificados, coronavírus.

INTRODUCCIÓN

El medicamento es un bien jurídico que se encuentra sometido a una estricta regulación con el objetivo de garantizar su calidad, eficacia y seguridad. Ya que “estriba principalmente en la posible peligrosidad que incluye la naturaleza y destino del medicamento” [1] y esto puede explicarse principalmente por dos razones. La primera de ellas es por el mandato constitucional de protección de la salud pública, según el artículo 43 de la *Constitución Española de 1978*: “se reconoce el derecho a la protección de la salud y compete a los poderes públicos organizar y tutelar la salud pública a través de medidas preventivas y de las prestaciones y servicios necesarios. La ley establecerá los derechos y deberes de todos al respecto” [2]. La segunda, el uso de medicamentos conlleva determinados riesgos para la salud, que es conveniente prevenir.

La venta de medicamentos a través de Internet ha supuesto una revolución para el mercado en general. Se trata de una actividad que debe de estar estrictamente regulada puesto que, existe el riesgo de que puedan venderse a través de esta vía medicamentos falsificados. Es imprescindible proporcionar un marco normativo para que la venta legal de medicamentos de uso humano, elaborados industrialmente y que no estén sujetos a prescripción, a través de Internet se haga con las garantías sanitarias necesarias, también es indispensable facilitar que los ciudadanos identifiquen los sitios web que venden legalmente medicamentos no sujetos a prescripción y puedan así distinguirlos de aquellos que los venden ilegalmente [3].

Es conveniente destacar que también existen numerosas ventajas de la venta de medicamentos telemática. La principal es que proporciona es la garantía de acceso al medicamento por parte de la población, tal y como se analizará en cuerpo del presente artículo,

esta modalidad de venta se empleó durante la crisis sanitaria provocada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

Desarrollo de la normativa relativa a la venta de medicamentos vía *on-line*

En 2000, con la extraordinaria expansión de las redes de telecomunicaciones y, en especial, de Internet como vehículo de transmisión e intercambio de todo tipo de información y su incorporación a la vida económica, fue preciso el establecimiento de un marco jurídico comunitario, que generase en todos los actores intervinientes la confianza necesaria para el empleo de este nuevo medio.

Así pues, se promulgó la Directiva 2000/31/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2000, relativa a determinados aspectos jurídicos de los servicios de la sociedad de la información, en particular el comercio electrónico en el mercado interior, con el objetivo de contribuir al correcto funcionamiento del mercado interior y garantizando la libre circulación de todo tipo de productos, incluidos los medicamentos, entre los Estados miembros.

Esta disposición se aplicó en el ordenamiento jurídico nacional por la Ley 34/2002, de 11 de julio, de servicios de la sociedad de la información y de comercio electrónico, y hace referencia al tema que nos ocupa en su disposición adicional segunda, sobre medicamentos y productos sanitarios, según la cual “la prestación de servicios de la sociedad de la información relacionados con los medicamentos y los productos sanitarios se regirá por lo dispuesto en su legislación específica” [4].

Por ello, el Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitario en su artículo 3.6, atribuye la capacidad de custodia, conservación y dispensación de medicamentos a las oficinas de farmacia legalmente autorizadas, a los servicios de farmacia de los hospitales, de los centros de salud y de las estructuras de atención primaria del Sistema Nacional de Salud [5].

Asimismo, en el apartado 5 del mismo artículo se limitó la venta por procedimientos telemáticos a los medicamentos no sujetos a prescripción médica, cuyas características y requisitos no se especificaron hasta la promulgación del Real Decreto 870/2013, de 8 de noviembre, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica.

Por último, es preciso destacar en el mencionado Real Decreto se alerta de la amenaza para la salud pública derivada de la posible venta ilegal de medicamentos al público a través de Internet, ya que por esta vía pueden llegar al público medicamentos falsificados, así como medicamentos no autorizados.

Los estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en esa época revelan que el 10% de medicamentos que se comercializaban en el mundo eran falsos [6]. Además, en los países industrializados, la mayor parte de la venta de medicamentos falsificados se realizaba a través de Internet. Según la OMS, el 50% de las medicinas compradas por Internet a través de páginas que ocultan su dirección física eran falsificadas.

Para reducir estos riesgos se reguló, a nivel europeo, la venta a distancia de medicamentos en la Directiva 2011/62/UE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal.

Esta directiva introducía por primera vez los dispositivos de seguridad para aquellos medicamentos con riesgos de falsificación. No obstante, sería cada país el que definiría los criterios de dichos dispositivos. Únicamente deberían cumplir la función de verificar la autenticidad del medicamento, identificar envases individuales y permitir verificar que el embalaje exterior no haya sido manipulado.

El problema de la venta de medicamentos falsificados a través de Internet continuó emergiendo. De hecho, en España durante 2013 se cerraron 220 páginas web porque se detectó una venta ilícita de productos sanitarios y se retiraron 14 medicamentos [7]. Por ello, la Unión Europea ha creado un logotipo común que sea identificable en todos los países comunitarios a través del Reglamento de Ejecución (UE) n.º 699/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014, sobre el diseño del logotipo común para identificar a las personas que ofrecen al público medicamentos por venta a distancia y los criterios técnicos, electrónicos y criptográficos a efectos de la verificación de la autenticidad de dicho logotipo. El mismo permite al usuario cerciorarse de que la página web está verificada y, por lo tanto, asegura el acceso del consumidor a medicamentos seguros y eficaces.

Por último, cabe destacar, la promulgación del Reglamento Delegado de la Unión Europea 2016/161 de la Comisión de 2 de octubre de 2015, que completa la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo estableciendo disposiciones detalladas relativas a los dispositivos de seguridad que figuran en el envase de los medicamentos de uso humano estableciendo unos dispositivos específicos de seguridad, para aquellos medicamentos de fabricación industrial con riesgo de falsificación, incluidos aquellos que no requieran prescripción médica y puedan ser objeto de venta a través de Internet.

A continuación, se analizarán las condiciones de venta de medicamentos por procedimientos telemáticos de acuerdo con la normativa mencionada.

Preceptos legales sobre la venta de medicamentos vía Internet

¿Qué tipo de medicamentos puede venderse a través de Internet?

Es preciso recordar que el ordenamiento jurídico español, en el Real Decreto 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de medicamentos y productos sanitarios, y siguiendo las directrices comunitarias, define medicamento de uso humano como “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas, ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico” [8].

El mismo decreto establece una lista cerrada de medicamentos reconocidos: aquellos medicamentos de uso humano y de uso veterinario elaborados industrialmente o en cuya fabricación interviene un proceso industrial, las fórmulas magistrales, los preparados oficinales y los medicamentos especiales.

Los medicamentos que se pueden comercializar a través de Internet se regulan en el artículo uno del Real Decreto 870/2013, de 8 de noviembre, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica. Este establece la venta legal al público realizada a distancia, únicamente, de medicamentos de uso humano elaborados industrialmente no sujetos a prescripción médica, a través de sitios web de oficinas de farmacia.

Según el artículo 19.4 del Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, los medicamentos no sujetos a prescripción médica irán “destinados a procesos o condiciones que no necesiten un diagnóstico preciso y cuyos datos de evaluación toxicológica, clínica o de su utilización y vía de administración no exijan prescripción médica” [8].

Condiciones de la venta de medicamentos a distancia al público

Con respecto a la venta de medicamentos a través de Internet, de acuerdo con el Real Decreto 870/2013, de 8 de noviembre, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica, es preciso que la venta sea realizada con la intervención de un farmacéutico, desde su oficina de farmacia y previo asesoramiento personalizado.

Los pedidos de dispensación de medicamentos no sujetos a prescripción médica se realizarán directamente a la oficina de farmacia a través del sitio web habilitado por esta incluyendo los siguientes datos: nombre y apellidos, teléfono, correo electrónico y dirección postal. Todo ello destinado a que el farmacéutico responsable de la dispensación pueda ponerse en contacto con el comprador si lo considerase oportuno. La oficina de farmacia también podrá habilitar cuestionarios para recoger información relevante para asegurar un buen uso del medicamento. La entrega al usuario irá acompañada de la información necesaria para que el usuario pueda utilizar el servicio de seguimiento farmacoterapéutico por parte del farmacéutico. Esta dispensación únicamente podrá realizarse directamente desde la oficina de farmacia, y no podrá haber intervención de ningún intermediario. Para asegurar que el medicamento llegue en el plazo de tiempo establecido en la compra, en el caso del que el plazo de entrega superase el 50 % del tiempo establecido en la compra por causas no imputables al usuario, este tendrá derecho a la devolución del medicamento y al reintegro del importe pagado.

Además, tal y como se ha mencionado, con la reciente entrada en vigor del Reglamento Delegado de la Unión Europea 2016/161 de la Comisión de 2 de octubre de 2015, que completa la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo estableciendo disposiciones detalladas relativas a los dispositivos de seguridad que figuran en el envase de los medicamentos de uso humano, para aquellos medicamentos, que a pesar de no requerir prescripción médica se consideren con elevado riesgo de falsificación, será de obligado cumplimiento que contengan un dispositivo de seguridad y, por lo tanto, el farmacéutico responsable de la dispensación así lo compruebe.

Estos dispositivos de seguridad obligatoriamente constarán de dos partes: un identificador único que permite verificar la autenticidad y la identificación de cada envase de un medicamento y estará incorporado en un código bidimensional *Datamatrix* y también en formato legible [9]; y un dispositivo contra las manipulaciones que permite verificar si el envase de un medicamento ha sido manipulado o no. Puede consistir en una lámina o un sello de plástico en el embalaje exterior, que el envase de cartón esté pegado o que tenga una sección de la caja dentada, la cual deba ser perforada para su apertura.

Por otro lado, desde las oficinas de farmacia autorizadas no podrán realizarse regalos, premios, obsequios, concursos, bonificaciones o actividades similares como medios vinculados a la promoción o venta al público de medicamentos mediante sitios web, sin perjuicio de los descuentos sobre el precio de venta que se contemplen en la normativa vigente.

Por último, de acuerdo con la normativa mencionada, la oficina de farmacia no podrá aceptar devoluciones de los medicamentos una vez hayan sido dispensados y entregados al cliente, salvo de aquellos medicamentos que hayan sido suministrados por error, no se

correspondan con el pedido o hayan sido dañados durante el transporte. No obstante, en todos los casos en los que los medicamentos hayan sido devueltos, irán destinados a su destrucción a través de sistemas integrados de gestión de residuos existentes.

Características del logotipo para la identificación de sitios web autorizados para la venta de medicamentos vía on-line

Tal y como se ha indicado con anterioridad, uno de los requisitos que debe contener el sitio web habilitado por la oficina de farmacia es la existencia de un logotipo que garantice que esta se encuentra verificada por las autoridades competentes.

Dicho logotipo se encuentra regulado mediante el Reglamento de Ejecución (UE) n.º 699/2014 de la comisión de 24 de junio de 2014, sobre el diseño del logotipo común para identificar a las personas que ofrecen al público medicamentos por venta a distancia y los criterios técnicos, electrónicos y criptográficos a efectos de la verificación de la autenticidad de dicho logotipo.

El modelo del logotipo común ha de tener unos colores especiales. Además, contiene la bandera nacional del Estado miembro en el que esté la oficina de farmacia que lleva a cabo la actividad de venta a distancia de medicamentos. El logotipo en cuestión contiene el texto: “haga clic aquí para verificar si este sitio web es legal”. Tanto la bandera nacional como el texto son una parte integral del logotipo. Además, se puede hacer clic en el logotipo y aparecerá en los sitios web de todos los minoristas de medicamentos en línea en la UE que estén registrados en los listados de la autoridad reguladora nacional [10].

Con esta unificación de criterios a la hora del diseño de del logotipo se intenta establecer un planteamiento homogéneo, para poder evitar los canales ilegales propensos a falsificar tanto medicamentos como los medios utilizados para la venta de los mismos, en nuestro caso farmacias *on-line* [11].

Problemática que presenta la venta de medicamentos vía *on-line*

El principal problema que presenta la venta de medicamentos vía *on-line* es que una buena parte de los medicamentos que se venden en Internet son medicamentos falsificados.

La Directiva 2011/62/UE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal define un “medicamento falsificado” como “cualquier medicamento cuya presentación sea falsa con respecto a su identidad, incluidos el envase y etiquetado, el nombre o composición en lo que respecta a cualquiera de sus componentes, incluidos los excipientes, y la dosificación

de dichos componentes; su origen, incluidos el fabricante, el país de fabricación, el país de origen y el titular de la autorización de comercialización, o su historial, incluidos los registros y documentos relativos a los canales de distribución empleados” [12].

El riesgo que genera la circulación de medicamentos falsificados en Internet son los daños para la salud que estos pueden provocar, los cuales pueden ser: efectos tóxicos agudos provocados por la ingesta de un principio activo tóxico o la evolución de enfermedades no tratadas, puesto que, algunos medicamentos falsificados no contienen el principio activo que dicen tener.

Según los últimos datos de actuaciones sobre medicamentos ilegales de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, el número de páginas web investigadas y los procedimientos de cesación por la venta de medicamentos ilegales fueron 497 en 2017, 415 en 2018 y 700 en 2019. El número de medicamentos retirados fue de 10 en 2017, 7 en 2018, y 22 en 2019 [13].

Por este motivo, la legislación que hemos desarrollado es fundamental para prevenir la entrada de medicamentos falsificados en la cadena legal de suministro, ya que los recursos *on-line* son una vía fácil de introducción de medicamentos falsificados en la cadena legal de suministro.

Venta de medicamentos por procedimientos telemáticos en situaciones especiales: caso de la crisis sanitaria provocada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2

En diciembre de 2019 se detectó un nuevo virus de la familia *Coronaviridae* que, posteriormente, se denominó SARS-CoV-2. El elevado número de personas contagiadas de esta enfermedad y su rápida propagación han elevado la situación a pandemia internacional.

Esta gran crisis sanitaria en la que se vio inmerso el país generó dificultades en la dispensación de medicamentos, lo cual dio lugar a nuevas condiciones de dispensación telemática de medicamentos, con el objetivo de garantizar el acceso de la población a los medicamentos.

El régimen al que están sometidos tanto los medicamentos como el acto de dispensación es común para todo el territorio nacional. En condiciones normales, las Comunidades Autónomas carecen de potestades en el ordenamiento jurídico farmacéutico y, en concreto, en las normas sobre la dispensación de medicamentos sujetos a prescripción médica. Este hecho está amparado por el artículo 149.1.16 de la Constitución Española, que establece que: “el Estado tiene competencia exclusiva sobre las siguientes materias: 16.ª Sanidad exterior. Bases y coordinación general de la sanidad. Legislación sobre productos farmacéuticos” [14].

Sin embargo, esta competencia, en condiciones de urgente necesidad y con carácter excepcional, podrá transferirse a las Comunidades Autónomas. Según la Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública, en su artículo 54 se establece que “con carácter excepcional y cuando así lo requieran motivos de extraordinaria gravedad o urgencia, la Administración General del Estado y las de las Comunidades Autónomas y las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla, en el ámbito de sus respectivas competencias, podrán adoptar cuantas medidas sean necesarias para asegurar el cumplimiento de la ley” [15] como ha ocurrido en esta crisis sanitaria.

Es conveniente destacar la Sentencia del Tribunal Constitucional 152/2003, de 17 de julio de 2003 según la cual “las CC.AA. pertinentes pueden también regular en relación con la dispensación de medicamentos aspectos que tengan propiamente que ver con la función de las farmacias al dispensarlos, siempre que la regulación correspondiente se oriente al establecimiento de reglas o criterios que atiendan al ejercicio ordinario de esta actividad de los establecimientos de farmacia, sea de índole técnica o meramente de entrega de material, y no ponga en cuestión los principios relativos a garantizar la seguridad de las prescripciones médicas y, con ello, la salud de los pacientes” [16].

Por lo tanto, a pesar de que la normativa vigente, tal y como se ha analizado, limita la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos únicamente a aquellos medicamentos no sujetos a prescripción médica, según el artículo 3. 5 del Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios: “las administraciones sanitarias, por razones de salud pública o seguridad de las personas, podrán limitar, condicionar o prohibir la venta a domicilio y cualquier tipo de venta indirecta al público de medicamentos y productos sanitarios” [17].

De esta forma, en algunas Comunidades Autónomas, durante el estado de alarma declarado para la contención de la pandemia, se promulgó una nueva norma que permitió la dispensación de cualquier medicamento telemáticamente, incluidos aquellos que requieran prescripción médica.

Este es el caso de Andalucía que, acogiendo a los derechos otorgados por estas normas, entre otras, promulgó la Orden de 26 de marzo de 2020, por la que se establece el protocolo para la dispensación de medicamentos y productos sanitarios por las oficinas de farmacia de Andalucía durante la situación de crisis sanitaria ocasionada por el coronavirus Covid-19, que en su primer artículo establece el protocolo de dispensación a domicilio de medicamentos y productos sanitarios por las oficinas de farmacia de Andalucía durante la situación de crisis sanitaria ocasionada por el Covid-19 [18].

Este protocolo que se adjunta en la mencionada orden está dirigido a personas (que no pueden apoyarse en otras) y que no puedan abandonar su domicilio por problemas de movilidad, enfermedad aguda, procesos crónicos incluidos en los grupos de mayor riesgo de infección por Covid-19, personas en situación de cuarentena domiciliaria por Covid-19 y personas que por su edad o especial fragilidad sean más vulnerables al contagio. Cualquier persona que pertenezca a alguno de los grupos puede ponerse en contacto a través de la plataforma que la oficina de farmacia registrada habilite o bien, por vía telefónica, para que esta le dispense a domicilio cualquier medicamento sometido o no a prescripción médica, así como productos sanitarios.

Las condiciones de dispensación son las mismas que las habituales, recordando siempre que este es un acto profesional que será siempre supervisado por una persona titulada o graduada en Farmacia, quien debe velar por que se cumplan las pautas establecidas por el facultativo prescriptor y realizar un seguimiento de los tratamientos farmacoterapéuticos a través de los procedimientos de atención farmacéutica mencionados en párrafos precedentes. El personal de la oficina de farmacia que actúe en esta modalidad de dispensación lo hará bajo la supervisión del farmacéutico titular de la oficina de farmacia.

DISCUSIÓN

En la sociedad actual, el Internet actúa como un gran protagonista tanto como para informarse como comprar y vender un gran número de productos, incluidos los medicamentos. La regulación de su venta a través de Internet garantiza la protección de la salud pública y la seguridad del paciente. Por ello, se ha creado un entramado normativo del que destacamos que: solamente pueden venderse a través de Internet medicamentos que no requieran receta médica. Esto es lógico puesto que, se pretende proteger al consumidor del uso irracional de aquellos medicamentos con más riesgo de efectos adversos, que son precisamente aquellos que requieren prescripción médica. Además, así se consigue que la única manera de conseguir este tipo de medicamentos sea acudiendo a la oficina de farmacia, de forma que el farmacéutico pueda ejercer una dispensación informada, dando todas las pautas de uso racional del medicamento y ofreciéndole al paciente un seguimiento farmacoterapéutico del mismo.

No obstante, en situaciones excepcionales como es el caso de la pandemia generada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, Internet se presenta como una herramienta muy útil a la hora de garantizar el acceso de los medicamentos a la población al tratarse de una situación tan extraordinaria, en la cual muchos pacientes se hallaban confinados en sus domicilios bien por encontrarse enfermos o bien por prevención. Por ello, durante

la pandemia se podían dispensar telemáticamente, tanto medicamentos sujetos a prescripción médica como aquellos que no la requiriesen.

Otro de los preceptos legales a destacar, es el logotipo común que facilita la identificación de las páginas web de venta de medicamentos legales. Este logotipo es de gran importancia, ya que garantiza al consumidor que la página web en la que pretende comprar se encuentra acreditada por las autoridades sanitarias correspondientes, puesto que, los medicamentos falsificados en la red, tal y como hemos desarrollado, es un gran problema que presenta la modalidad venta de medicamentos objeto de estudio. Así pues, para la prevención de la distribución ilícita de medicamentos falsificados en el territorio nacional es muy necesaria la investigación de las redes de fabricación y distribución de medicamentos falsificados, ilegales y productos adulterados. También, son de gran importancia las campañas de información dirigidas al público a través de las cuáles se informa de cómo identificar una página web de venta de medicamentos legal.

CONCLUSIONES

Desde el punto de la seguridad del paciente es lógico que se limitase la venta de medicamentos sujetos a prescripción médica únicamente en el acto de dispensación en oficinas de farmacia físicas. No obstante, durante la crisis sanitaria generada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 se ha ampliado el marco normativo de la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos a aquellos que requieran prescripción médica. Dicha modificación se ha realizado con el fin de la garantizar la dispensación asegurando la protección de todos los pacientes y, en especial, de los más vulnerables. Con el paso del tiempo, es probable que se amplíe el marco normativo, dando lugar a la autorización de venta de medicamentos sujetos a prescripción médica a través de procedimientos telemáticos. Si bien, lo primordial es garantizar la seguridad del usuario y solventar la problemática generada por los medicamentos falsificados.

CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Baes, La justificación del intervencionismo administrativo en el sector del medicamento: especial referencia a la autorización sanitaria, *Derecho y salud*, 21(extra 1), 9-37 (2011).

2. Constitución Española de 1978, *Boletín Oficial del Estado*, **311**, (29 de diciembre de 1978), p. 3-39.
3. Real Decreto 870/2013, de 8 de noviembre, Por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica, *Boletín Oficial del Estado*, **269**, (9 de noviembre de 2013), p. 90156-90163.
4. Ley 34/2002, de 11 de julio, De servicios de la sociedad de la información y de comercio electrónico, *Boletín Oficial del Estado*, **166**, (12 de julio de 2002), p. 5-37.
5. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, Por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, *Boletín Oficial del Estado*, **177**, (25 de julio de 2015), p. 62935-63030.
6. Organización Mundial de la Salud, *Productos médicos de calidad Subestándar falsificados*, URL: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products>, consultado el 21 de enero de 2021.
7. Interpol, *Operación internacional contra el suministro en línea de medicamentos falsos e ilegales*, 14 de octubre de 2010. URL: <https://www.interpol.int/es/Noticias-y-acontecimientos/Noticias/2009/Operacion-internacional-contrael-suministro-en-linea-de-medicamentos-falsificados-e-ilegales>, consultado el 14 de diciembre de 2020.
8. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, Por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, *Boletín Oficial del Estado*, **177**, (25 de julio de 2015), p. 62935-63030.
9. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, *Verificación de medicamentos en oficina de farmacia. Preguntas y respuestas*, Versión I, Nodofarma, Madrid, 2019, 14 p.
10. Reglamento de Ejecución (UE) n.º 699/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014, Sobre el diseño del logotipo común para identificar a las personas que ofrecen al público medicamentos por venta a distancia y los criterios técnicos, electrónicos y criptográficos a efectos de la verificación de la autenticidad de dicho logotipo, *Diario Oficial de la Unión Europea*, **184**, (25 de junio de 2014), p. L184/5-L184/7.
11. C. del Castillo-Rodríguez, La comercialización de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica a través de Internet, como reacción de

- la sociedad a la expansión del uso de medicamentos falsificados, *Derecho y Salud*, **25**(Extra 1), 112-118 (2015).
12. Directiva 2011/62/UE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, Que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal, *Diario Oficial de la Unión Europea*, **174**, (1 de julio de 2011), p. 74-87.
 13. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, *Memoria sobre actuaciones 2019*, URL: <https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/memoria/docs/memoria-2019.pdf?x9809>, consultado el 2 de febrero de 2020.
 14. Constitución Española de 1978, *Boletín Oficial del Estado*, **311**, (29 de diciembre de 1978), p. 3-39.
 15. Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública, *Boletín Oficial del Estado*, **240**, (5 de octubre de 2011), p. 104593-104626.
 16. Tribunal Constitucional de España, Sentencia 152/2003, de 17 de julio, *Boletín Oficial del Estado*, **193**, (13 de agosto de 2003), 152. URL: <http://hj.tribunalconstitucional.es/es-ES/Resolucion/Show/4927>, consultado el 8 de febrero de 2021.
 17. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, Por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, *Boletín Oficial del Estado*, **177**, (25 de julio de 2015), p. 62935-63030.
 18. Orden de 26 de marzo de 2020, Por la que se establece el protocolo para la dispensación de medicamentos y productos sanitarios por las oficinas de farmacia de Andalucía durante la situación de crisis sanitaria ocasionada por el coronavirus Covid-19, *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía Extraordinario*, **12**, (30 de marzo de 2020), p. 94-99.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

S. Enríquez-Fernández, Regulación de la venta de medicamentos por procedimientos telemáticos en España: riesgos y ventajas en situaciones excepcionales, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(2), 476-489 (2021).

Incorporación de un novedoso complejo de tinidazol con propiedades antimicrobianas a dos formas semisólidas de uso tópico

Dina Marcela Martínez Carmona¹, Gloria Elena Tobón Zapata^{2*}

Grupo de investigación Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Cl. 67 # 53 - 108, Medellín, Antioquia, Colombia. Fax: [57+4]2638282.

¹ Correo electrónico: dinamar1788@gmail.com

^{2*} Autora para correspondencia. Correo electrónico: elena.tobon@udea.edu.co

Recibido: 2 de agosto de 2019

Revisado: 2 de marzo de 2021

Aceptado: 8 de marzo de 2021

RESUMEN

Introducción: el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos comúnmente empleados para el tratamiento de infecciones cutáneas pone en manifiesto la necesidad de encontrar medicamentos alternativos y eficaces, capaces de contrarrestar este problema de salud que no sólo implica una región, sino que se ha convertido en un problema de salud mundial. Se ha demostrado que un novedoso complejo a base de tinidazol y cobre ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$) posee buena actividad antimicrobiana, sin embargo, para que pueda emplearse como una alternativa para el uso tópico, debe poseer las características necesarias para incorporarse en una formulación que permita su aplicación. **Objetivo:** las formas farmacéuticas semisólidas constituyen el grupo más empleado dentro de las formulaciones dermatológicas; se elaboraron dos tipos formulaciones una tipo crema y otra crema-gel, con el fin de verificar en cuál de ellas incorpora convenientemente el complejo $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$. Para ambas formulaciones se determinaron las propiedades organolépticas, pH, área de extensibilidad, viscosidad, y tamaño de partícula del complejo. **Resultados:** obtenidos evidencian las ventajas de la formulación tipo crema frente a la crema-gel.

Palabras claves: Compuesto de coordinación, crema, crema-gel, extensibilidad.

SUMMARY

Incorporation of a novel tinidazole complex with antimicrobial properties into two semi-solid topical forms

Introduction: the increase in bacterial resistance to antibiotics commonly used for the treatment of skin infections highlights the need to find alternative and effective drugs, capable of counteracting this health problem that not only involves a region but has become into a global health problem. A novel complex based on tinidazole and copper ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$) has been shown to have good antimicrobial activity, however, in order to be used as an alternative for topical use, it must have the characteristics necessary to be incorporated into a formulation that allows its application. **Aim:** semi-solid pharmaceutical forms are the most widely used group within dermatological formulations; Two types of formulations were elaborated, one type of cream and the other cream-gel, in order to verify in which of them the complex $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$ is conveniently incorporated. For both formulations, the organoleptic properties, pH, area of extensibility, viscosity, and particle size of the complex were determined. **Results:** obtained show the advantages of the cream-type formulation compared to the cream-gel.

Keywords: Complex, cream, cream-gel, extensibility.

RESUMO

Incorporação de um novo complexo de tinidazol com propriedades antimicrobianas a duas formas semissólidas para uso tópico

Introdução: o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos comumente utilizados no tratamento de infecções cutâneas evidencia a necessidade de encontrar medicamentos alternativos e eficazes, capazes de fazer frente a esse problema de saúde que não envolve apenas uma região, mas se tornou um problema de saúde global. Um novo complexo à base de tinidazol e cobre ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$) demonstrou ter boa atividade antimicrobiana, porém, para ser utilizado como alternativa para uso tópico, deve ter as características necessárias para ser incorporado em uma formulação que permita sua aplicação. **Objetivo:** as formas farmacêuticas semissólidas são o grupo mais utilizado nas formulações dermatológicas; foram elaborados dois tipos de formulações, um tipo creme e outra creme-gel, a fim de verificar em qual delas o complexo $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$ está convenientemente incorporado. Para

ambas as formulações foram determinadas as propriedades organolépticas, pH, área de extensibilidade, viscosidade e tamanho de partícula do complexo. **Resultados:** os obtidos mostram as vantagens da formulação tipo creme em relação ao gel-creme.

Palavras-chave: Complexo, creme, creme-gel, extensibilidade.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo es la resistencia a los antibióticos. Cada vez es mayor el número de infecciones (neumonía, tuberculosis, gonorrea, salmonelosis, entre otras) cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos tradicionales. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), si no se toman medidas urgentes, muchas infecciones comunes y lesiones menores volverán a ser potencialmente mortales [1].

En consecuencia, se ha prestado atención a los agentes antimicrobianos seguros, nuevos o alternativos en el campo de la quimioterapia antimicrobiana. Las infecciones tópicas de la piel ocurren con frecuencia y a menudo representan desafíos terapéuticos para los profesionales de la salud, a pesar de los numerosos agentes antimicrobianos disponibles en la actualidad.

El cobre es bien conocido por sus propiedades antimicrobianas. Se ha utilizado como algicida, germicida y fungicida durante décadas. Varios mecanismos antimicrobianos del cobre fueron propuestos en artículos recientes, incluida la formación de radicales hidroxilo, reactivos que conduce al daño de la integridad celular, la desnaturalización del ADN mediante la unión del cobre a las moléculas de proteínas, la inactivación de enzimas y la obstrucción de los grupos funcionales de proteínas por el desplazamiento de iones esenciales [2-4]. También se ha demostrado que los iones de cobre tienen actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, responsables de infecciones comunes en piel [5]. Estudios previos han demostrado que las sales de zinc y cobre inactivan el virus del herpes simple tipo 1 (VHS), responsable del herpes labial, tanto *in vivo* como *in vitro* [6-9]. Otros estudios demuestran la eficacia de una sal de cobre (sulfato) en el tratamiento de la pitiriasis versicolor, una infección micótica superficial de la piel generalmente causada por especies de *Malassezia* [10, 11]. La pitiriasis versicolor es una de las enfermedades cutáneas más comunes en regiones tropicales y subtropicales que se caracteriza por parches y máculas escamosas finas [12].

Por otro lado, el tinidazol es utilizado ampliamente como un agente antiprotozoario, su actividad frente a microorganismos anaerobios lo hace un medicamento eficaz [13].

En esa línea, la modificación de una molécula biológicamente activa mediante la incorporación de un metal, para dar lugar a un complejo de coordinación tiene como ventaja la obtención de una molécula mejorada en aspectos tales como potencia, estabilidad, reducción de efectos secundarios o la posibilidad de una administración dirigida [14].

La investigación sobre la actividad biológica de los compuestos de coordinación derivados de imidazol con iones de metales de transición ha demostrado que la actividad citotóxica del ligando se ve reforzada por la presencia del metal. El anillo imidazólico posee múltiples sitios de unión, lo que lo hace capaz de coordinarse con una variedad de iones metálicos inorgánicos o de interactuar con moléculas orgánicas a través de enlaces no covalentes para producir medicamentos supramoleculares, que pueden tener no sólo bioactividad, sino posiblemente ejercer mecanismos de doble acción que son útiles para superar resistencias a fármacos [15, 16].

La actividad antimicrobiana del nuevo complejo ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$) fue evaluada previamente frente a cepas de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* exhibiendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 mg/mL [17, 18].

La actividad antimicrobiana del cobre y de los compuestos imidazólicos se ha investigado durante muchos años, sin embargo, la incorporación de un compuesto de coordinación con cobre como ingrediente antimicrobiano no se ha evaluado en formulaciones tópicas. El objetivo del presente estudio fue formular una crema y crema-gel tópicos que contengan un novedoso complejo de tinidazol con cobre y evaluar sus características, estabilidad inicial al cabo de 36 meses.

PARTE EXPERIMENTAL

Elaboración de la crema y crema-gel a base del complejo

Para la elaboración de las dos formas farmacéuticas tópicas (crema y crema-gel) como formas de dosificación del compuesto se empleó una técnica tradicional, que implicó la fusión de las grasas (fase A) y el calentamiento de la fase acuosa (fase B) para su posterior homogenización. En el caso de la crema-gel se preparó una fase adicional (fase C) correspondiente al gel, posteriormente, se incorporó el complejo en la fase acuosa de forma mecánica, a una concentración de 1 %. Se tuvo en cuenta el cálculo del HLB para las formulaciones. Las diferentes proporciones de las materias primas utilizadas se muestran a continuación:

Crema-gel

Fase A: aceite mineral 1,0 %, alcohol cetílico 2,5 %, alcohol estearílico 2,5 %, monoestereato de glicerilo 3,5 %, miristato de isopropilo 2,5 %, Vitamina E 0,3 %.

Fase B: agua desionizada 59 %, conservante 0,2 %, Twen 20 2,5 %.

Fase C: carbopol 0,2 %, agua 25 %, trietanolamina (99 %) 0,2 %.

Crema

Fase A: monoestereato de glicerilo 2,2 %, alcohol cetílico 1,8 %, alcohol estearílico 1,8 %, miristato de isopropilo 2,0 %, lanolina 1,0 %. Emulgin B1 3,1 %, Emulgin B2 0,9 %.

Fase B: agua desionizada 81 %, glicerina 5,0 %, agente conservante 0,2 %, pantenol 1,0 %.

Tamaño de partícula

Para determinar tamaño de partícula se empleó un equipo Zetasizer Nano, y el procesamiento de las mediciones se llevó a cabo mediante el *software* Zetasizer versión 7.11.

Viscosidad

Se midió la viscosidad en un viscosímetro Brookfield modelo LVDV-II+, con aguja N.º 4. Las mediciones se realizaron por triplicado, en el tiempo inicial y transcurridos 36 meses a partir de la elaboración de las formulaciones.

Determinación de la extensibilidad

Para determinar la extensibilidad de las dos formulaciones y de una formulación comercial (con fines comparativos) se tomaron dos láminas de vidrio de 15x15 cm. Se añadieron 2 g del semisólido, pesados en balanza técnica digital, en el centro de una de las placas ubicada sobre una hoja de papel milimetrado, posteriormente, se sobrepuso cuidadosamente la otra lámina de vidrio. Transcurridos 5 minutos se determinó la distancia desde el punto de aplicación hasta donde extendió el semisólido. Se midió la extensibilidad en 4 direcciones perpendiculares entre sí [19]. Se repitió esta operación adicionando pesos sucesivos de 50, 100, 200 y 300 g colocados en el centro de la placa superior. Las mediciones se hicieron por triplicado, los resultados registrados son el promedio y se graficaron las masas (g) contra el área de extensibilidad (cm²). Se calculó el área del círculo formado aplicando la ecuación 1.

$$E = A = p \times \frac{d_1 \times d_2}{4} \quad (1)$$

Donde: A : área (cm²), d_1 y d_2 : diámetros perpendiculares a la circunferencia formada (cm), y E : extensibilidad del semisólido.

Medición en reómetro

Se midió para los dos semisólidos en reómetro MCR 92 Anton Paar, a dos temperaturas 25 y 35 °C, por triplicado a los 36 meses de que las formulaciones fueron elaboradas.

Diseño experimental

La presente investigación corresponde a un diseño cuasi experimental, tomando en cuenta que no se manipulan variables deliberadamente, su tendencia es cualitativa con alcance descriptivo, el propósito fue evaluar la estabilidad preliminar que presentan las dos formulaciones semisólidas (crema y crema-gel) elaboradas a base del complejo de tinidazol sintetizado. En cuanto a la recolección de datos, se tomó la media y se calculó la desviación estándar de las mediciones hechas por triplicado. Para la interpretación de los resultados hay que considerar otros factores no tenidos en cuenta.

RESULTADOS

Características organolépticas

Su determinación y observación proporcionó una primera impresión de la calidad del semisólido. Estas características se evaluaron a las formulaciones recién elaboradas, después de 24 horas y a los 15 días de la preparación, para examinar homogeneidad, textura, consistencia, color y olor. La tabla 1 muestra los resultados de la prueba organoléptica inicial para los preparados semisólidos.

Tabla 1. Características organolépticas de crema y crema-gel.

Semisólido	Crema	Crema-gel
Tiempo 0	Semisólido de aspecto homogéneo, textura cerosa, cremosa y color verdoso.	Semisólido homogéneo, textura fluida, consistencia ligera y color verde intenso.
24 horas	Semisólido de aspecto homogéneo, textura cerosa, cremosa y color verdoso.	Semisólido homogéneo, textura fluida, consistencia ligera y color verde intenso.
15 días	Semisólido de aspecto homogéneo, textura cerosa, cremosa y color verdoso.	Semisólido homogéneo, textura fluida, consistencia ligera y color verde intenso.
36 meses	Semisólido de aspecto homogéneo, textura cerosa, cremosa y color verdoso.	Semisólido homogéneo, textura fluida, consistencia ligera y color verde intenso.

En la tabla 1 se puede apreciar que la crema y la crema-gel exhibieron un aspecto homogéneo, una textura cerosa para la crema y un color verdoso aportado por el complejo a diferencia de la crema-gel que presentó una textura fluida (figura 1), se apreció un cambio de color a uno más intenso en cuanto a la crema gel una vez transcurridos los 36 meses, de otro lado, la crema conserva su color inicial.

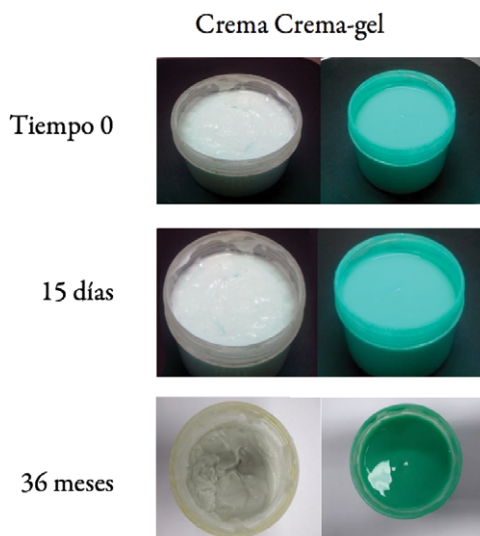


Figura 1. Fotografía de la crema y crema-gel, en los diferentes tiempos.

La crema mantuvo su color y la intensidad del mismo durante el tiempo de almacenamiento. Las propiedades organolépticas se conservaron hasta el tiempo final del estudio. La crema se describe como un semisólido de aspecto uniforme, libre de grumos y arenosidad y olor característico. Por otro lado, aunque no se detectaron grumos en la crema-gel ni otros síntomas relacionados con problemas de estabilidad física, si se observó un ligero cambio de color después de 36 meses.

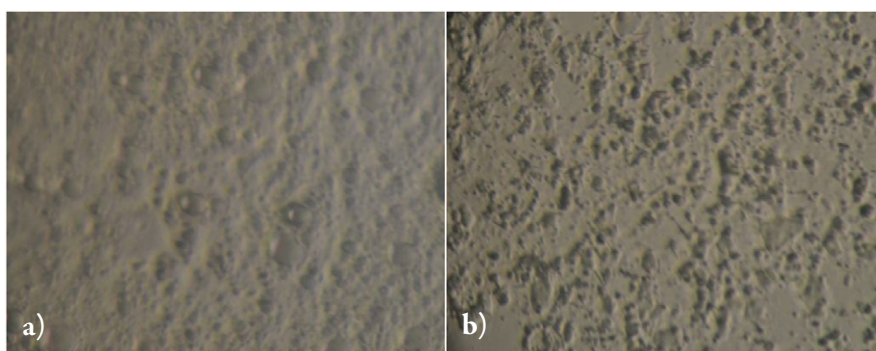


Figura 2. Microfotografía de los semisólidos: a) crema, b) crema-gel.

Las microfotografías de las formulaciones de la crema y la crema-gel con el activo incorporado se pueden apreciar en la figura 2. En la crema se observó una estructura con gotitas que corresponde a la fase oleosa, en la crema-gel estas gotas estaban ausentes, y se

observó una discontinuidad, debida a la incorporación de aire durante la preparación. Se pueden observar diferencias de los semisólidos con respecto a otros preparados, en la crema se ven diferenciadas las fases acuosa y oleosa, dándole características de fluidez y la capacidad de satisfacer las exigencias fisiológicas de la piel, liberar uniformemente materias hidrosolubles y liposolubles en la piel, a diferencia de las pomadas y ungüentos que constan de una sola fase en la que se dispersa sólidos o líquidos y no fluyen con facilidad.

Viscosidad y pH

Se determinó la viscosidad y el pH de los semisólidos, para la crema se obtuvo un resultado promedio de viscosidad de 65 983 cP y para la crema gel un valor de 30 321 cP a una temperatura de 22 °C, el valor de pH para la crema fue $5,60 \pm 0,01$, y para la crema-gel fue $6,00 \pm 0,01$. En la segunda medición después de quince días, la viscosidad de la crema dio un valor de 65 995 cP y pH de $5,40 \pm 0,01$, mientras que para la crema-gel el valor de viscosidad fue de 31432 cP y el pH de $5,91 \pm 0,01$. Transcurridos los 36 meses se obtuvo una viscosidad de 66 3617 cP y 37 612 cP a una temperatura de 22 °C, y valores de pH $5,20 \pm 0,01$ y $5,80 \pm 0,01$ para la crema y crema-gel, respectivamente.

Extensibilidad

Se midió el aumento de superficie que experimenta cierta cantidad del semisólido cuando se somete a la acción de una serie de pesos a intervalos fijos de tiempo. Se utilizó como control un semisólido comercial de buena extensibilidad. Los resultados se muestran en la figura 3.

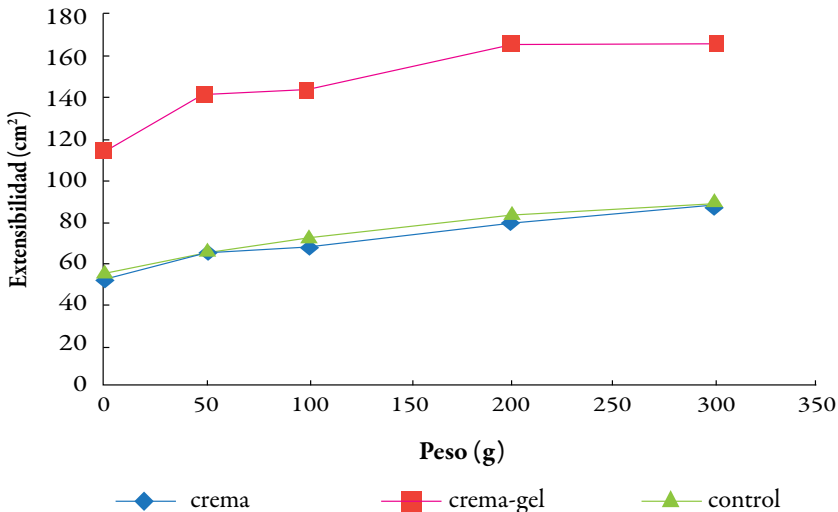


Figura 3. Gráfica de extensibilidad de los semisólidos y control.

Después de 36 meses, los resultados de esta medida se muestran en la figura 4. El área de extensibilidad mostró un ligero decrecimiento, con variaciones en los dos últimos pesos de 4,60 y 10,45 cm². Estos resultados fueron lógicos, ya que en las etapas iniciales ocurre la estructuración del sistema que tiene lugar de forma progresiva, lo cual se refleja en un aumento de la consistencia, expresado por la disminución del área de extensibilidad tanto para crema como la crema-gel.

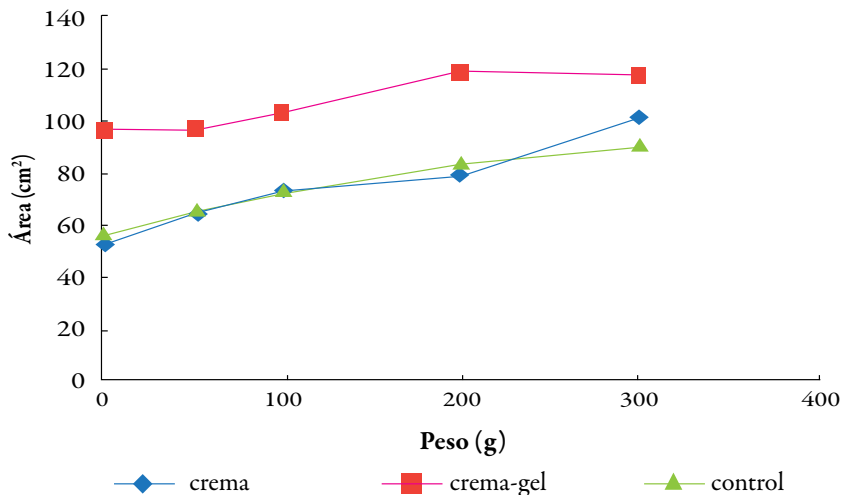


Figura 4. Gráfica de extensibilidad de los semisólidos después de 36 meses.

Tamaño de partícula

En relación con el tamaño de partícula, se hizo la medición de la crema con y sin complejo incorporado, esta medición sirvió de criterio para hacer una aproximación a la capacidad de penetración del semisólido a través de las diferentes capas de la piel, a continuación, en la figura 5 se muestra la determinación del tamaño de partícula para la crema.

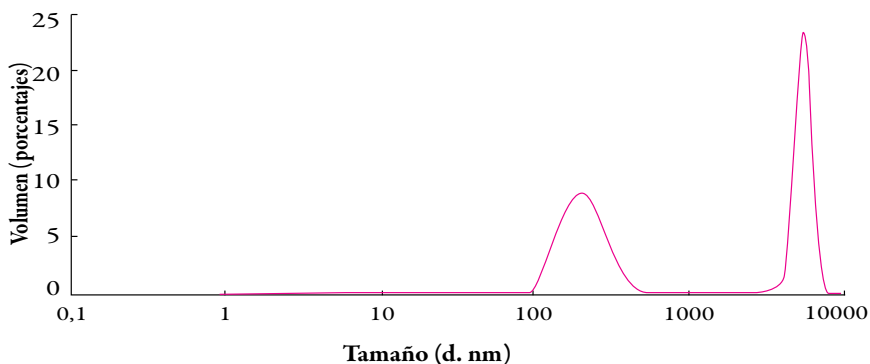


Figura 5. Resultado de la medición del tamaño de partícula en crema.

Hay dos poblaciones de partículas, como se observa en la figura 5, la primera con un tamaño de 216,5 nm y un porcentaje de 52,3 % y la segunda con 5590 nm y un porcentaje de 47,7 %, estos tamaños de partícula dieron un indicio del nivel de penetración dérmica, ya que diversos estudios señalan que existe una relación de permeación cutánea dependiente del tamaño de partícula, por ejemplo, algunos autores [20] notaron una mayor permeabilidad en piel de rata para nanopartículas de oro de 15 nm en comparación con partículas de oro de 102 y 198 nm y concluyeron que el coeficiente de permeabilidad a través de la piel era decreciente al aumentar el tamaño de partícula. Por su parte, otros autores [21], en su estudio para el uso de nanopartículas en vacunación transcutánea, informaron que las nanopartículas de 40 nm penetraron en la piel humana y entraron en la epidermis, pero no fue así para las de 750 o 1500 nm, mostrando la relación del tamaño de partículas en la absorción dérmica. Es importante tomar en cuenta este aspecto porque puede estimarse de acuerdo con el tamaño de partícula si el principio activo alcanza la circulación sistémica y así se puede evitar posibles efectos secundarios.

En esta investigación, en relación con el tamaño de partícula, esta medición se realizó después de 36 meses a los semisólidos, la determinación del tamaño de partícula para la crema fue de 347,9 nm y para la crema gel de 1004,7 nm, estos resultados sugieren que la crema sólo penetró hasta el estrato córneo, es decir, que no pasará más allá de la epidermis y evidenció la estabilidad de la crema.

Mediciones en reómetro

Se midió el flujo de los dos semisólidos a los 36 meses, a dos temperaturas 25 y 35 °C, las curvas se muestran en las figuras 6 y 7, respectivamente.

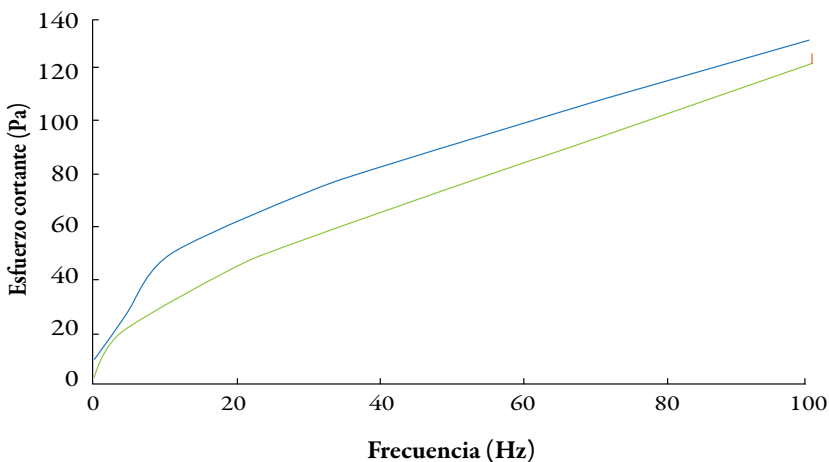


Figura 6. Gráfica de la curva de flujo a 25 °C para la crema después de 36 meses.

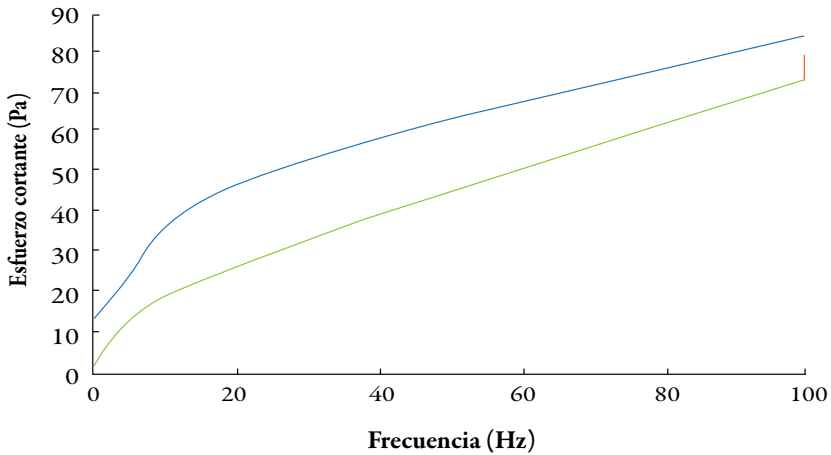


Figura 7. Gráfica de la curva de flujo a 35 °C para la crema después de 36 meses.

Con la curva de flujo los datos se ajustan a diferentes modelos reológicos, el modelo de Herschel-Bulkley es el que presenta el mejor ajuste y se relaciona con la ecuación 2:

$$Y = t_0 + kg^n \quad (2)$$

Donde Y es el esfuerzo cortante, t_0 es el esfuerzo umbral, k es el índice de consistencia, g es la tasa de corte y n es el índice del comportamiento al flujo. Cuando $n = 1$ se trata de fluidos newtonianos, cuando $n < 1$ se trata de fluidos pseudoplásticos, y cuando $n > 1$ se tiene comportamiento reopéctico.

Los parámetros ajustados del modelo a temperatura de 25 °C son: $t_0 = 1,5202$ Pa, $k = 7,1082$, $n = 6,61272$, y $r^2 = 0,99903$. Mientras que estos parámetros a 35 °C son: $t_0 = 3,0432$ Pa, $k = 2,955$, $n = 0,68853$, y $r^2 = 0,99884$. Para el área de histéresis a las mismas temperaturas los datos arrojados son: 1386,5 Pa/s a 25 °C y 1577,1 Pa/s a 35 °C.

Las curvas de flujo se realizan en tres fases: ascenso, mantenimiento y descenso. Con la curva de ascenso se evidencia el comportamiento de flujo de la formulación, luego la de mantenimiento se realiza a la mayor frecuencia posible buscando deformar la muestra y la de descenso evidencia si la muestra es capaz de recuperar su forma o si la pierde. Los resultados de la crema-gel se muestran en las figuras 8 y 9.

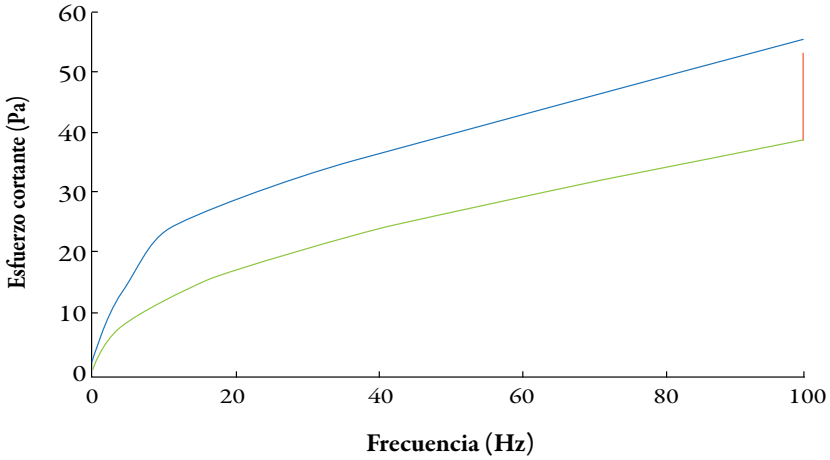


Figura 8. Gráfica de la curva de flujo a 25 °C para la crema gel después de 36 meses.

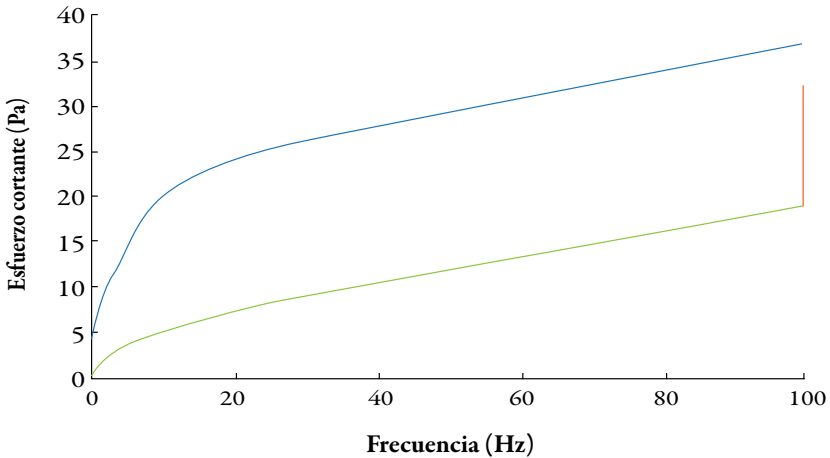


Figura 9. Gráfica de la curva de flujo a 35 °C para la crema gel después de 36 meses.

Con la curva de flujo los datos se ajustan a diferentes modelos reológicos, al igual que para la crema, el modelo que mejor se ajusta es el de Herschel-Bulkley (ecuación 2). Los parámetros ajustados del modelo a 25 °C son: $t_0 = 0,64822$ Pa, $k = 2,7165$, $n = 0,59642$, y $r^2 = 0,9901$. Mientras que los parámetros a 35 °C son: $t_0 = 0,25793$ Pa, $k = 1,2762$, $n = 0,5768$, y $r^2 = 0,9987$. Para el área de histéresis los datos arrojados son: 1651,6 Pa/s a 25 °C y 1288,9 Pa/s a 35 °C.

DISCUSIÓN

Una vez elaborados y almacenado, los dos semisólidos conservaron sus características de homogeneidad, textura, consistencia, color y olor, el cambio en la intensidad del color observado en la crema-gel se debió a que el carácter traslúcido del gel hace que el color del complejo sobresalga. Ambas formulaciones mostraron un buen comportamiento desde el punto de vista organoléptico, cabe resaltar que la crema presenta características organolépticas agradables y por su consistencia puede aplicarse fácilmente en diferentes zonas de la piel de acuerdo con la necesidad del paciente, además, la crema posee una buena extensibilidad que permite su fácil aplicación y distribución en la zona afectada. El pH de las formulaciones se ajustó de manera que no afectara el pH natural de la piel, conservando el manto ácido que sirve como barrera protectora. El seguimiento del pH indicó que este permanece estable y no alteraría el equilibrio natural de la piel. La conservación del pH es un factor de importancia, dado que una alcalinización de la formulación podría impedir la síntesis de lípidos esenciales de la epidermis y la piel perdería agua, deshidratándose y perdiendo la función de barrera protectora. El ensayo de extensibilidad proporcionó una medida del umbral de deformación del sistema. La extensibilidad es inversamente proporcional a la consistencia del semisólido y proporcional al peso aplicado. El comportamiento de la formulación en crema, en cuanto a este parámetro, se asemejó al de la crema usada como control lo que indica que aun con la incorporación del complejo presenta una extensibilidad aceptable para este tipo de formulaciones de uso tópico que requieren buena untuosidad y distribución homogénea en la zona afectada. Este estudio evidenció la estabilidad de la crema incluso tras 36 meses de almacenamiento, sin embargo, es recomendable realizar estudios complementarios de estabilidad para esta clase de semisólidos.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. Organización mundial de la salud (OMS), *Resistencia a los antibióticos*, URL: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>, consultado el 15 de febrero de 2018.
2. M. Sierra, A. Sanhueza, R. Alcántara, G. Sánchez, Antimicrobial evaluation of copper sulfate (II) on strains of *Enterococcus faecalis*. *In vitro* study, *Journal of Oral Research*, **2**(3), 114-118 (2013).

3. G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, Metallic copper as an antimicrobial surface, *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(5), 1541-1547 (2011).
4. R. Gyawali, S.A. Ibrahim, Synergistic effect of copper and lactic acid against *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7: a review, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **24**(1), 1-11 (2012).
5. J.J. Zeelie, T.J., McCarthy, Effects of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine, *Analyst*, **123**(3), 503-507 (1998).
6. M. Arens, S. Travis, Zinc salts inactivate clinical isolates of herpes simplex virus *in vitro*, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(5), 1758-1762 (2000).
7. J.A. Fernández-Romero, C.J. Abraham, A. Rodriguez, *et al.*, Zinc acetate/carrageenan gels exhibit potent activity *in vivo* against high-dose herpes simplex virus 2 vaginal and rectal challenge, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**(1), 358-368 (2012).
8. J.-L. Sagripanti, L.B. Routson, A.C. Bonifacino, C.D. Lytle, Mechanism of copper-mediated inactivation of herpes simplex virus, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**(4), 812-817 (1997).
9. A. Clewell, M. Barnes, J.R. Endres, M. Ahmed, D.K.S. Ghambeer, Efficacy and tolerability assessment of a topical formulation containing copper sulfate and *Hypericum perforatum* on patients with herpes skin lesions: a comparative, randomized controlled trial, *Journal of Drugs in Dermatology*, **11**(2), 209-215 (2012).
10. G.H. Jameel, W.M. Al-Shamery, R.O. Hussain, *et al.*, Treatment of pityriasis versicolor by 2 % solution of copper sulfate, *Diyala Journal for Pure Sciences*, **10**(1), 129-134 (2014).
11. K.E. Sharquie, R.K. Hayani, W.S. Al-Dori, *et al.*, Treatment of pityriasis versicolor with topical 15 % zinc sulfate solution, *Iraqi Journal of Community Medicine*, **21**(1), 61-63 (2008).
12. Z. Zarrab, M. Zanardelli, A. Pietrzak, *et al.*, *European Handbook of Dermatological Treatments: Tine Versicolor*, Springer, Berlin, Germany, 2015.
13. H.B. Fung, T. Doan, Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent, *Clinical Therapeutics*, **27**(12), 1859-1884 (2005).

14. K.L. Haas, K.J. Franz, Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology, *Chemical Reviews*, **109**(10), 4921-4960 (2009).
15. C.H. Zhou, L.L. Gan, Y.Y. Zhang, F.F. Zhang, G.Z. Wang, L. Jin, R.X. Geng, Review on supermolecules as chemical drugs, *Science in China Series B: Chemistry*, **52**, 415-458 (2009).
16. C.H. Zhou, Y.Y. Zhang, C.Y. Yan, K. Wan, L.L. Gan, Y. Shi, Recent researches in metal supramolecular complexes as anticancer agents, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **10**(5), 371-395 (2010).
17. D.M. Martínez-Carmona, *Compuestos de coordinación de tinidazol con potencial efecto antimicrobiano y elaboración de una preformulación tópica*, Tesis de maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, 2017.
18. D.M. Martínez-Carmona, G.E. Tobón-Zapata, J.S. Rivera-Villamizar, Estudio del potencial efecto antimicrobiano de algunos compuestos de coordinación de tinidazol, *Revista Cubana de Farmacia*, **51**(4) (2019), URL: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view>
19. D.M. Soler, Y. Rodríguez, T. Pérez, L. Sánchez, R. Lazo, *Extensibilidad en la preformulación de un gel a partir de Rhizophora mangle L.*, Memorias del III Simposio Internacional de Química, Sociedad Cubana de Química, La Habana, Cuba, 2007.
20. G. Sonavane, K. Tomoda, A. Sano, *et al.*, *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **65**(1), 1-10 (2008).
21. A. Vogt, B. Combadiere, S. Hadam, *et al.*, 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin, *Journal of Investigative Dermatology*, **126**(6), 1316-1322 (2006).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

D.M. Martínez-Carmona, G.E. Tobón-Zapata, Incorporación de un novedoso complejo de tinidazol con propiedades antimicrobianas a dos formas semisólidas de uso tópico, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 490-504 (2021).

Synthesis and antileishmanial activity of naphthoquinone-based hybrids

Délis Galvão Guimarães¹, Sidney Silva Simplicio², Valéria Carlos de Sousa³, Klinger Antonio da Franca Rodrigues⁴, Fernando Aécio A. Carvalho³, Sabrina M. P. Carneiro³, Marcília Pinheiro da Costa³, Arlan de A. Gonsalves¹, Cleônia Roberta M. Araújo^{2*}

¹ Postgraduate of Northeast Biotechnology Network, Federal University Rural of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Postgraduate of Health and Biological Sciences Program, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

³ Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

⁴ Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Parnaíba Delta, Parnaíba, Piauí, Brazil.

* Corresponding author e-mail: cleonia.araujo@univasf.edu.br

Received: January 21, 2021

Corrected: March 11, 2021

Accepted: March 15, 2021

SUMMARY

Introduction: leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is considered endemic in 98 countries. Treatment with pentavalent antimonials has a high toxicity, which motivates the search for effective and less toxic drugs. α - and β -lapachones have shown different biological activities, including antiprotozoa. In recent studies, the isonicotinoylhydrazone and phthalazinylhydrazone groups were considered innovative in the development of antileishmania drugs. Molecular hybridization is a strategy for the rational development of new prototypes, where the main compound is produced through the appropriate binding of pharmacophoric subunits. **Aims:** to synthesize four hybrids of α - and β -lapachones, together with the isonicotinoylhydrazone and phthalazinylhydrazone groups and to determine the antileishmania activity against the promastigotic forms of *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. major*. **Results:** β -lapachone derivatives were more active against all tested leishmania species. β ACIL (IC₅₀ 0.044 μ M) and β HDZ (IC₅₀ 0.023 μ M) showed 15-fold higher activity than amphotericin B. The high selectivity index exhibited by the compounds indicates greater safety for vertebrate host cells. **Conclusion:** the results of this work show that the hybrids β ACIL and β HDZ are promising molecules for the development of new antileishmania drugs.

Keywords: β -lapachone, α -lapachone, molecular hybridization, hydralazine, isoniazid, hydrazone.

RESUMEN

Síntesis y actividad antileishmania de híbridos naftoquinónicos

Introducción: leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania* y se considera endémica en 98 países. El tratamiento con antimoniales pentavalentes tiene una alta toxicidad, lo que motiva la búsqueda de fármacos eficaces y menos tóxico. α - y β -lapachones han mostrado diferentes actividades biológicas, incluido los antiprotozoarios. En estudios recientes, los grupos isonicotinoilhidrazona y ftalazinilhidrazona se consideraron innovadores en el desarrollo de fármacos antileishmania. La hibridación molecular es una estrategia para el desarrollo racional de nuevos prototipos, donde el compuesto principal se produce a través de la unión apropiada de subunidades farmacofóricas. **Objetivos:** sintetizar cuatro híbridos de α - y β -lapachones, junto con los grupos isonicotinoilhidrazona y ftalazinilhidrazona y determinar la actividad antileishmania frente a las formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. major*. **Resultados:** los derivados de β -lapachone fueron más activos contra todas las especies de leishmania probadas. La β ACIL (CI_{50} 0,044 μ M) y β HDZ (CI_{50} 0,023 μ M) mostraron actividad 15 veces mayor que la anfotericina B. El alto índice de selectividad que presentan los compuestos indica una mayor seguridad para las células huésped del vertebrado. **Conclusión:** los resultados de este trabajo demuestran que los híbridos β ACIL y β HDZ son moléculas prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos antileishmania.

Palabras clave: β -lapachone, α -lapachone, hibridación molecular, hidralazina, isoniazida, hidrazona.

RESUMO

Síntese e atividade antileishmania de híbridos naftoquinônicos

Introdução: a leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada endêmica em 98 países. O tratamento com antimoniais pentavalentes apresenta alta toxicidade, o que motiva a pesquisa por medicamentos eficazes e menos tóxicos. α - e β -lapachones têm mostrado diferentes atividades biológicas, incluindo antiprotozoários. Em estudos recentes, os grupos isonicotinoilhidrazona e ftalazinilhidrazona foram considerados inovadores no desenvolvimento de drogas antileishmania. A hibridização molecular é uma estratégia para o desenvolvimento racional de novos protótipos, onde o composto principal é produzido através da ligação apropriada de subunidades farmacofóricas. **Objetivos:** sintetizar

quatro híbridos de α - e β -lapachones, juntamente com os grupos isonicotinoil-hidrazona e ftalazinilhidrazona e determinar a atividade antileishmania contra as formas promastigóticas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. major*. **Resultados:** os derivados de β -lapachona foram mais ativos contra todas as espécies de leishmania testadas. BACIL (IC₅₀ 0,044 μ M) e β HDZ (IC₅₀ 0,023 μ M) apresentaram atividade 15 vezes maior do que a anfotericina B. O alto índice de seletividade dos compostos indica maior segurança para células hospedeiras de vertebrados. **Conclusão:** os resultados deste trabalho mostram que os híbridos β ACIL e β HDZ são moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania.

Palavras-chave: β -lapachona, α -lapachona, hibridização molecular, hidralazina, isoniazida, hidrazona.

INTRODUCTION

Leishmaniasis are neglected parasitic diseases caused by more than 20 protozoan species of the genus *Leishmania*, considered endemic in 98 countries [1]. Transmission to humans occurs during the blood repast of Phlebotomines from the Phlebotomus (Old World) and Lutzomyia (New World) families. Only the hematophagous females are responsible for the inoculation of promastigote forms in the host's skin [2]. The species *Leishmania amazonensis* is associated with the development of cutaneous leishmaniasis with the formation of necrotic ulcers, and is capable of causing the disseminated form of the disease [3].

Pharmacological therapy with pentavalent antimonials (*N*-methylglucamine antimoniate) is the first choice treatment, and amphotericin B and pentamidine are the second choice [4]. And there are successful reports of the use of miltefosine in cases of antimonium-resistant protozoa [5, 6]. However, the treatment of leishmaniasis is still a difficulty, considering that the available pharmacological therapies present limitations in terms of efficacy and safety, prolonging the treatment; therefore, a range of adverse reactions, the need for parenteral administration, in addition to the possible emergence of resistance, lead to low adherence to treatment by patients.

Several efforts search for bioactive natural compounds that can be used in the treatment of parasitic diseases [7]. Lapachol, α - and β -lapachones are promising natural naphthoquinones for Medicinal Chemistry due to their structural properties. Goulart *et al.* described the leishmanicidal activity of lapachol and some derivatives, showing the pharmacological potential of these substances [8]. In 2013, Guimarães *et al.* presented the

activity of lapachol, α - and β -lapachones against the promastigote forms of four species of the genus *Leishmania*, ratifying the relevance of these naphthoquinones in the development of new leishmanicides [9].

In a study published this year, Souza *et al.* (2020) pointed out the relevance of the presence of isonicotinoylhydrazone and phthalazinylhydrazone nuclei in the structures of compounds for the antileishmanial activity. In this work, the authors synthesized five hydrazones and evaluated *in vitro* the activity against the promastigote form of *L. amazonensis* [10].

The development of new substances with therapeutic potential is a complex task involving multi and interdisciplinary efforts. Several strategies are used by Medicinal Chemistry uses to make the process of developing new drugs more effective. Molecular planning is one of the crucial steps in the process, and Molecular Hybridization (MH) is an effective alternative for the rational design of molecular structures of new prototype compounds. In this proposal, hybrid compounds are the result of joining molecular structures of distinct bioactive compounds [11, 12].

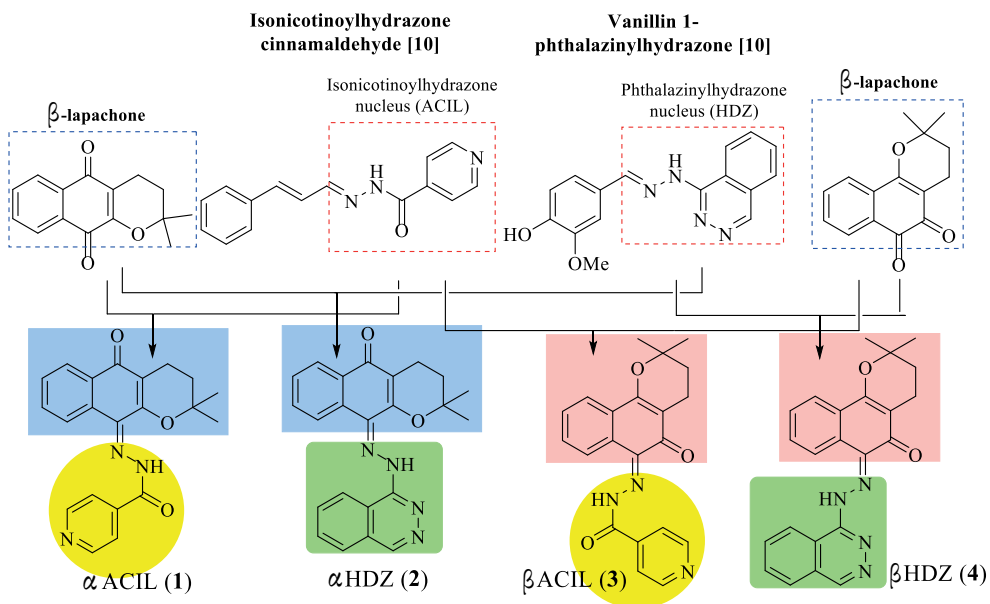


Figure 1. Scheme of the designer of hybrid compounds α ACIL (1), α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4).

Considering the activity against protozoa of the genus *Leishmania* presented by the α -, β -lapachones and compounds containing the isonicotinoylhydrazone (ACIL) and

phthalazinylhydrazone (HDZ) nuclei, four compounds were designed through the of MH strategy employing the molecular structures of the naphthoquinones and the ACIL and HDZ nuclei, as shown in figure 1. Subsequently, the hybrids were prepared and had their activities evaluated against the promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. major*, besides the cytotoxic evaluation in murine macrophages.

MATERIALS AND METHODS

For the synthesis, all the reagents used were obtained from commercial sources and used without prior purification, with the exception of hydralazine hydrochloride, which was obtained from Apresolina® pills (Anovis Industrial Farmacêutica Ltda) [10, 13]. The synthesized substances had its melting temperatures determined in triplicate using analog fusimeter, model PFM-II (MS Tecnopon® instrumentation). The chromatographic profile of the substances was determined by Analytical Thin Layer Chromatography (TLC), using 2x4 cm aluminum/silica gel 60 plates with UV₂₅₄ fluorescence indicator, revealed in ultraviolet (UV) or with iodine (I₂). The purification in chromatographic column used silica gel 60 (70 - 230 mesh) and ethyl acetate/hexane (AcOEt/Hex) mixture with increasing polarity, as a mobile phase. After preparation and purification all, the synthesis products were stored under refrigeration and protected from light.

The structural elucidation of naphthhydrazones α ACIL (**1**), α HDZ (**2**), β ACIL (**3**) e β HDZ (**4**) was performed using ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance techniques (¹H and ¹³C NMR) [13]. The NMR spectra have been registered in a Bruker Ascend TM 400 device, which operates at 400 MHz for the ¹H nuclei and at 100 MHz for the ¹³C nuclei. The chemical displacements (δ) were given in ppm using tetramethylsilane solvent (TMS) as internal standard. All samples were solubilized in deuterated solvent (CDCl₃ or DMSO-d₆).

Infrared (IR) absorption spectra were obtained using PerkinElmer® (Spectrum 400) equipment with Attenuated Total Reflectance (ATR) device with zinc selenide crystal, from 4000 to 650 cm⁻¹, and 4 cm resolution⁻¹.

Extraction, purification, and characterization of lapachol

Lapachol was extracted from the stalk of the ipe (*Tabebuia sp.*). The splinters of the heartwood were submerged in an aqueous solution of sodium hydroxide (NaOH) at 1% (m·v⁻¹) for about 24 h. The filtrate was then acidified with a solution hydrochloric acid 6 M (HCl), and the lapachol was precipitated in the aqueous medium as a yellow solid. The solid was filtered by vacuum filtration and dried at room temperature.

Lapachol was purified by recrystallization from ethanol/water. Yellow crystalline solid, yield of 1.5 % (m/m) and melting point (m.p.): 138.33-140.33 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 8.12 (1H, m, H5); 8.07 (1H, m, H8); 7.75 (1H, td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, H6); 7.67 (1H, td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, H7); 7.33 (1H, s, -OH); 5.21 (1H, m, H10); 3.31 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, -CH₂); 1.79 (3H, s, -CH₃); 1.69 (3H, s, -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 184.59 (C4); 181.70 (C1); 152.67 (C2); 134.87 (C6); 133.87 (C4 and C11); 132.88 (C7); 129.41 (C8); 126.77 (C5); 126.06 (C8); 123.45 (C3); 119.62 (C10); 25.77 (-CH₃); 22.61 (C9); 17.90 (-CH₃).

Synthesis, purification, and characterization of α-lapachone

Lapachol (1 mmol; 242 mg) was dissolved in a solution of glacial acetic acid (AcOH; 240 μL) and concentrated HCl (630 μL). It was heated to 100 °C for 1.5 h, and then cooled to room temperature. The reaction mixture was poured into a beaker containing cold distilled water, the precipitated pale yellow solid was filtered and dried at room temperature. The obtained solid was purified by simple recrystallization using ethanol. Yellow crystals, yield of 71 % and m.p.: 116.33-117.66 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 8.08 (2H, m, H6 and H9); 7.68 (2H, m, H7 and H8); 2.63 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H4); 1.83 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H3); 1.44 (6H, s, 2-CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 184.42 (C5); 180.03 (C10); 154.62 (C1); 133.87 (C7); 132.93 (C8); 132.07 (C5↔C9); 131.16 (C9↔C5); 126.33 (C6); 125.97 (C9); 120.15 (C4); 78.17 (C2); 31.41 (C3); 26.51 (2-CH₃); 16.74 (C4).

Synthesis, purification, and characterization of β-lapachone

Cooled concentrated sulfuric acid (H₂SO₄) (730 μL) was added to a reaction vessel (25 mL) containing lapachol (1 mmol; 242 mg) and immersed in an ice bath at 0 °C. The reaction was stirred for 20 min. Then, the reaction mixture was poured into a beaker containing cold distilled water, the precipitated orange solid was filtered and dried at room temperature. β-lapachone was purified by column chromatography. Reddish-orange crystals, yield of 69 % and m.p.: 154.66-158.0 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 7.91 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H7); 7.77 (2H, m, H9 and H10); 7.61 (1H, m, H8); 2.40 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H4); 1.82 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H3); 1.43 (6H, s, 2-CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 179.06 (C6); 177.83 (C5); 160.65 (C1); 135.02 (C9); 132.10 (C10); 130.84 (C8); 129.96 (C6); 127.83 (C7); 123.70 (C10); 112.51 (C4); 79.07 (C2); 30.81 (C3); 26.33 (2-CH₃); 15.97 (C4).

General procedure for the preparation of the compounds αACIL (1) and βACIL (3)

To a methanolic solution (5 mL) containing isoniazid (90 mg, 0.6 mmol) and the appropriate naphthoquinone (121 mg, 0.5 mmol) (α- or β-lapachone) was added a

drop of concentrated HCl (37%). The reaction mixture was stirred until complete consumption of naphthoquinone. The crystals formed were filtered, washed with methanol and distilled water and dried at room temperature. The product was purified by column chromatography [13].

General procedure for the preparation of compounds α HDZ (2) and β HDZ (4)

In a solution containing hydralazine hydrochloride (1.5 mmol) in methanol (11 mL), H₂SO₄ concentrate (approximately 700 μ L) was slowly added, followed by appropriate naphthoquinone (121 mg, 0.5 mmol) (α - or β -lapachone). After the end of the reaction, the mixture was neutralized with 5% (m·v⁻¹) NaHCO₃ solution. The precipitate formed was filtered, washed with distilled water and dried at room temperature. The product was purified by column chromatography [13].

Data from α ACIL (1): (Z)-N²-(2,2-dimethyl-5-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromen-10(5H)-ylidene)isonicotinohydrazide

The reaction mixture remained under agitation at room temperature for 72 h [13]. Greenish-yellow solid (figure 2), yield of 11.3% and m.p.: 226.50-227.83 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 12.80 (1H, s, N-H); 8.86 (1H, m, H16 and H18); 8.52 (1H, d, J = 7.9 Hz, H9); 8.11 (1H, m, H6); 7.74 (2H, dd, J = 4.4; 1.6 Hz, H15 and H19); 7.64 (1H, dd, J = 12.9; 4.6 Hz, H8); 7.54 (1H, t, J = 7.5 Hz, H7); 2.69 (2H, t, J = 6.1 Hz, H4); 1.93 (2H, t, J = 6.3 Hz, H3); 1.53 (6H, s, 2 -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 183.43 (C5); 161.99 (C13); 154.51 (C1a); 150.94 (C16 and C18); 140.39 (C14); 134.93 (C10); 133.22 (C9a); 132.45 (C8); 129.84 (C7); 129.61 (C5a); 125.70 (C6); 124.93 (C9); 120.96 (C15 and C19); 117.33 (C4a); 79.91 (C2); 31.14 (C3); 26.97 (2 -CH₃); 16.88 (C4). IR (ATR, ν in cm⁻¹): 3330 (N-H); 1697 (C=O; N-C=O); 1633 (C=N); 1605-1455 (C=C_{Ar}); 1265-1229 and 874 (C-O); 907-688 (C-H_{Ar}). HRMS (ES⁺) calculated for C₂₁H₁₉N₃O₃ [M+H]⁺: 362.1504. Found: 362.1469.

Data from α HDZ (2): (Z)-2,2-dimethyl-10-(2-(phthalazin-1-yl)hydrazono)-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromen-5(10H)-one

The reaction mixture remained under stirring and reflux for 6 h [13]. Red crystalline solid (figure 2), yield of 10.1% and m.p.: 238.83-240.50 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 11.11 (1H, s, N-H); 9.75 (1H, d, J = 8.1 Hz, H9); 8.56 (1H, dd, J = 6.1; 3.2 Hz, H15); 8.27 (1H, dd, J = 7.8; 1.4 Hz, H6); 8.10 (1H, s, H20); 7.80 (2H, m, H16 and H17); 7.66 (2H, m, H8 and H18); 7.53 (1H, m, H7); 2.66 (2H, t, J = 6.7 Hz, H4); 1.84 (2H, t, J = 6.7 Hz, H3); 1.46 (6H, s, 2 -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 184.37 (C5); 159.37 (C1a); 150.96 (C13); 141.73 (C10); 140.13

(C20); 133.06 (C17); 132.39 (C16); 131.59 (C8); 130.90 (C9); 130.83 (C5a); 129.33 (C7); 128.89 (C9a); 127.82 (C19↔C14); 126.71 (C14↔C19); 126.41 (C18); 126.11 (C6); 125.34 (C15); 113.51 (C4a); 77.36 (C2); 31.75 (C3); 26.74 (2 -CH₃); 17.09 (C4). IR (ATR, ν in cm⁻¹): 3346 (N-H); 1622 (C=O; C=N); 1598 and 1572 (C=N; -C=N-N=C-); 1488, 1448 and 1396 (C=C_{Ar}); 1368 and 1350 (C-N); 1246-1231 and 865 (C-O); 907-691 (C-H_{Ar}). HRMS (ES⁺) calculated for C₂₃H₂₀N₄O₂ [M+H]⁺: 385.1664. Found: 385.1657.

Data from β ACIL (3): (E)-N⁷-(2,2-dimethyl-5-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ylidene)isonicotinohydrazide

The reaction mixture was stirred at room temperature for 10 minutes [13]. Yellow-orange solid (figure 2), yield of 66 % and m.p.: 237.66-238.50 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 8.86 (2H, d, J = 5.8 Hz, H16 and H18); 8.46 (1H, s, -NH); 7.89 (4H, m, 7H7, H10, H15 and H19); 7.50 (2H, m, H8 and H9); 2.61 (2H, t, J = 6.6 Hz, H4); 1.90 (2H, t, J = 6.7 Hz, H3); 1.49 (6H, s, 2 -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 182.29 (C5); 163.38 (C1a and C13); 150.76 (C16 and C18); 139.67 (C14); 131.40 (C6 and C6a↔C10a); 130.51 (C8); 129.45 (C9); 127.00 (C10a↔C6a); 124.52 (C7); 123.42 (C10); 121.53 (C15 and C19); 111.24 (C4a); 79.09 (C2); 31.60 (C3); 26.77 (2 -CH₃); 15.99 (C4). IR (ATR, ν in cm⁻¹): 3350 (N-H); 1703 (C=O; N-C=O); 1597 (C=N); 1558, 1511, 1493 and 1394 (C=C_{Ar}); 1230 (C-O); 918-693 (C-H_{Ar}). HRMS (ES⁺) calculated for C₂₁H₁₉N₃O₃ [M+H]⁺: 362.1504. Found: 362.1486.

Data from β HDZ (4): (E)-2,2-dimethyl-6-(2-(phthalazin-1-yl)hydrazono)-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromen-5(6H)-one

The reaction mixture remained at room temperature for 78 h [13]. Orange crystalline solid (figure 2), yield of 22.4% and m.p.: 237.16-239.00 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 9.30 (1H, s, H20); 8.56 (2H, dd, J = 7.6; 3.8 Hz, H7 and H15); 7.95 (4H, m, H10, H16, H17 and H18); 7.55 (1H, m, H8); 7.45 (1H, m, 1H, H9); 2.70 (2H, t, J = 6.7 Hz, H4); 1.92 (2H, t, J = 6.7 Hz, H3); 1.49 (6H, s, 2 -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ in ppm): 181.42 (C5); 161.87 (C1a); 148.40 (C20); 132.69 (C17); 132.47 (C6 and C13); 132.40 (C16); 132.29 (C6a); 129.92 (C8); 128.17 (C19↔C14); 127.74 (C9); 126.84 (C18); 125.75 (C10a); 123.51 (C7); 122.99 (C10); 122.35 (C15); 118.78 (C14↔C19); 111.15 (C4a); 78.21 (C2); 31.78 (C3); 26.80 (2 -CH₃); 16.19 (C4). IR (ATR, ν in cm⁻¹): 1612 (C=O; C=N; -C=N-N=C-); 1588 (C=N; -C=N-N=C-); 1501, 1437 and 1395 (C=C_{Ar}); 1225 and 862 (C-O); 900-691 (C-H_{Ar}). HRMS (ES⁺) calculated for C₂₃H₂₀N₄O₂ [M+H]⁺: 385.1664. Found: 385.1686.

Determination of the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of naphthhydrazones on the promastigotic forms of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* and *Leishmania infantum*

The promastigote forms of *Leishmania* were kept cryopreserved in liquid nitrogen and in Schneider's^o medium (Sigma, Chemical - USA) supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS), 100 IU·mL⁻¹ penicillin-streptomycin (Sigma) and glycerol as cryopreservative. To perform the assays, the parasites were thawed and kept in the same medium, without cryopreserver, at 26 ± 1 °C in a biological oxygen demand oven (Eletrolab EL202, São Paulo, Brazil). The promastigotic forms of *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friendli) and *Leishmania infantum* (MHOM/5745) in stationary growth phase were washed in 0.9% sterile saline solution, counted in Neubauer chamber and the volume adjusted to the desired concentration. The substances α ACIL (1), α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4) were added to the microplate wells for cell culture, in triplicate, and serial dilutions were performed, reaching twelve concentration ranges (0.0097 to 20 μ g·mL⁻¹). Soon after, the parasites were sown in the amount of 1×10⁶ leishmanias/100 μ L of supplemented medium. The plate was then incubated in an oven at a temperature of 26 °C for 48h and, 6h remaining for the end of this period, 20 μ L of 1×10⁻³ mol·L⁻¹ resazurin was added, and the plate was incubated again. After the incubation period, the reading was performed on a 550 nm wavelength absorption plate reader (Biosystems model ELx800, Curitiba, PR, Brazil). For positive control, amphotericin B was used at a concentration of 2 μ g·mL⁻¹, diluted in a supplemented Schneider's medium. The negative control was equivalent to Schneider's medium containing 1×10⁶ promastigotes per well and, in this case, the viability was 100% for the parasite. The reading of white, for each concentration and for the controls was necessary to disregard the absorbance resulting from the medium itself with interference or not of the substances studied. From these absorbances the concentration able to inhibit the growth in 50% of the parasites was calculated (IC₅₀) [14, 15].

Determination of the mean cytotoxic concentration (CC₅₀) of synthetic naphthoquinone on RAW macrophages

The assessment of macrophage cytotoxicity was performed using the MTT assay (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). In the plates of 96 wells, 2×10⁵ macrophages of the RAW 264.7 strain were incubated per well in 100 μ L of RPMI 1640 medium (supplemented with 10% SFB, 10 000 IU penicillin and 1000 IU streptomycin) in an oven at 37 °C and 5% CO₂ for 4 h for cell adhesion. The supernatant was then withdrawn to remove the non-adhered cells. The

DMSO solubilized naphthahydrazonic derivatives were diluted in RPMI supplemented medium, added to the plate containing the macrophages in serial concentrations reaching twelve ranges of final concentrations, starting from $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and incubated at 37°C and 5% of CO_2 for 48 h. After this period, the cytotoxicity was evaluated by adding 10% MTT at a concentration of $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, diluted in $100 \mu\text{L}$ of RPMI medium, and the plate was incubated again for 4 h at 37°C and 5% of CO_2 . At the end of this period, the supernatant was discarded and the formazan crystals were dissolved by adding $100 \mu\text{L}$ DMSO. Finally, the absorbance (550 nm) was measured using a Biotek plate reader (ELx800) [16]. The mean cytotoxic concentration CC_{50} (μM) was determined from the linear portion of the curve, calculating the concentration of the compound that reduced the absorbance in treated macrophages by 50% compared to negative control cells. The selectivity index (SI) was calculated by the ratio between CC_{50} and IC_{50} [17].

Statistical analysis

All the biological trials were performed in three independent experiments. The mean inhibitory concentration (IC_{50}) and the mean cytotoxic concentration (CC_{50}) with 95% confidence limit were calculated using probit regression. Analysis of variance ANOVA followed by Bonferroni's test was performed taking $p < 0.05$ as the maximum level of statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of the naphthohydrazones αACIL (1), αHDZ (2), βACIL (3) and βHDZ (4)

The hybrid compounds designed from α - and β -lapachones, with the isonicotinoylhydrazone and phthalazinyldihydrazone nuclei were called αACIL (1), αHDZ (2), βACIL (3) and βHDZ (4) (figure 1). The prefixes α - and β - refer to lapachol derivatives, α - and β -lapachones, and ACIL and HDZ refer to the isonicotinoylhydrazone and phthalazinyldihydrazone nuclei, respectively. The hybrids were synthesized by condensation reaction between α - and β -lapachones with isoniazid and hydralazine through acid catalysis, as described by Guimarães *et al.* (2020) [13]. The reaction yields varied between 10% and 66% , and the compounds had their molecular structures established by NMR, IR and MS techniques (figure 2).

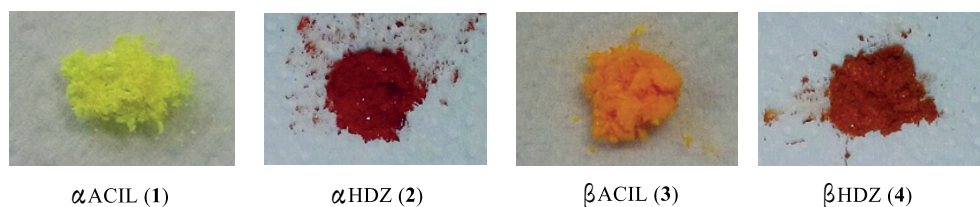
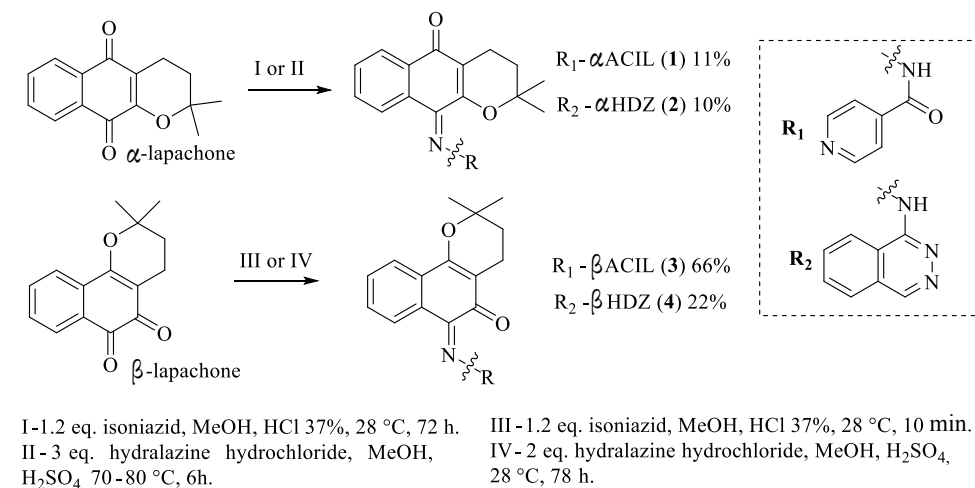


Figure 2. Scheme of the synthesis reaction of the designed compounds α ACIL (1), α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4).

Antileishmanial activity of naphthohydrazones

The performance of *in vitro* tests of antileishmanial activity only in promastigote forms has been used as a screening test [16-20]. The *in vitro* evaluation of the antileishmanial activity of naphthohydrazones α ACIL (1), α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4) has shown that these four hybrids were effective against promastigotic forms of *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. major*, this action being dependent of the concentration of the substance in test and the species of the parasite. When comparing the results obtained with the antileishmanial capacity of the precursor naphthoquinones (α - and β -lapachones) it was observed that the majority of the hybrids were more active.

Among the hybrids of α -lapachone both compounds, α ACIL (1) and α HDZ (2), showed high antileishmanial activity in at least one of the strains tested in the experimental time of 48 h. However, α HDZ (2) was more potent against *L. amazonensis* and *L. major*, with IC₅₀ of 0.156 and 0.572 μ M, respectively (table 1). Naphthohydrazone 2 showed higher activity than its precursor, α -lapachone (IC₅₀ 16.08 μ M in 72 h of experiment) [9] for *L. amazonensis*, exhibiting 103 times higher activity in a shorter

experimental time (48 h). For *L. infantum*, α ACIL (1) and α HDZ (2) presented activity 24 and 4 times higher, respectively, than α -lapachone (IC₅₀ 13.88 μ M in 72 h of experiment) [9], in an experimental time of 48 h.

The most active compounds against all the promastigotic forms of leishmanias tested were those that have the framework of phenanthrene, as occurs in β -lapachone and its hybrids β ACIL (3) and β HDZ (4). While 3 had the lowest IC₅₀ (0.318 μ M) against *L. infantum*, compound 4 was the most potent against *L. amazonensis*, with a IC₅₀ of 0.023 μ M. Both hybrids, 3 and 4, were more active than the precursor compound, β -lapachone, on all tested strains of leishmanias. β ACIL (3) was 65 times more active than β -lapachone (IC₅₀ 2.90 μ M in 72 h of experiment) [9] for *L. amazonensis*; whereas, β HDZ (4) was 126 times more active than the precursor orthonaphthoquinone in *L. amazonensis*. Compared to *L. infantum*, hybrids 3 and 4 were 2 times more active than β -lapachone (table 1).

When comparing the IC₅₀ of the synthesized naphthohydrazones with the amphotericin B, it can be affirmed that after exposure to *L. amazonensis* and *L. major*, the majority of the naphthohydrazones presented activity superior to the positive control. Highlight to β HDZ (4) over *L. amazonensis* and β ACIL (3) compared to *L. major*, both with action 15 times greater than amphotericin B. Regarding *L. infantum*, the compounds 3 and 4 presented activity similar to the standard drug (table 1).

Table 1. *In vitro* antileishmanial activity in promastigotic forms of *L. Amazonensis*, *L. major* and *L. infantum* of synthetic naphthohydrazones, in 48 h of experimental time.

	<i>L. amazonensis</i> ^a		<i>L. infantum</i> ^a		<i>L. major</i>		RAW 264.7
	IC ₅₀ (μ M) ^a	SI ^c	IC ₅₀ (μ M) ^a	SI ^c	IC ₅₀ (μ M) ^a	SI ^c	CC ₅₀ ^b
α ACIL (1)	>5.534	< 0.840	0.578±0.028	8.043	1.356±0.111	3.428	4.649±0.055
α HDZ (2)	0.156±0.052	24.179	3.408±0.026	1.107	0.572±0.156	6.594	4.649±0.055
β ACIL (3)	0.0443±0.028	52.460	0.318±0.055	7.308	0.044±0.083	52.818	2.324±0.055
β HDZ (4)	0.023±0.026	42.956	0.318±0.05	8.821	1.145±0.107	0.863	0.988±0.078
α -Lap	16.08 ^d	- ^f	13.88 ^d	- ^f	- ^f	- ^f	- ^f
β -Lap	2.90 ^d	- ^f	0.67 ^d	- ^f	>104 ^e	- ^f	- ^f
AnfB	0.35±0.3 ^g	0.8	0.3±0.1	0.93	0.68±0.151	0.41	0.28±0.09

^aIC₅₀: concentration of the compound that causes 50 % mortality.

^bCC₅₀: concentration of the compound that causes 50 % of macrophage mortality.

^cSI – CC₅₀/IC₅₀ when SI >1 means higher toxicity to the parasite.

^dIC₅₀ (μ M) in 72 h (Guimarães *et al.*, 2013) [9].

^eTanga 2013 [21].

^fNon-existent Result.

^gDias *et al.*, 2020 [22].

Leishmaniasis are intracellular macrophage parasites in vertebrate hosts; therefore, assessing toxicity to these cells is essential when planning a drug for the treatment of visceral or tegumentary leishmaniasis [23]. The factor used to measure this safety was the selectivity index (SI), which is calculated by the ratio between the Cytotoxic Concentration for 50% of macrophages (CC_{50}) and IC_{50} . The molecules that present $SI > 1$ and $SI > 20$ are classified, respectively, as good and high safety, and those of high safety are qualified for further studies in infected macrophages and *in vivo* models [24, 25].

The tested naphthohydrazones showed good safety for use as antileishmanial, highlighting the hybrid β ACIL (3), 52 times more selective for *L. amazonensis* and *L. major* than for the host cell. The compounds that have the HDZ nucleus, α HDZ (2) and β HDZ (4), also showed high safety for mammalian cells with SI of 42,956 and 24,179, respectively, when used on promastigotes of *L. amazonensis*. These results qualify the naphthohydrazones α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4) for the trials on infected macrophages and *in vivo* models. Among the compounds tested, α ACIL (1) and β HDZ (4) were the most selective for *L. infantum* in relation to macrophages, presenting SI of 8.821 and 8.043, respectively.

Although the mechanism of action of naphthohydrazones on leishmanias is not known, the results of this work show that the compounds promoted damage in the morphological structure of these parasites (figure 3). Among these changes, the variation in parasite size, scourge and shape stand out. According to Rodrigues *et al.* (2014) [26] and Gadelha *et al.* (2013) [27], such changes may be caused by the destabilization of the tubulin-dependent cytoskeleton, since both the parasite's body shape and the scourge's integrity are highly dependent on the stability of the microtubules.

Although naphthohydrazones have relatively complex molecular structures, they were prepared using accessible compounds, the lapachol, a natural product from a renewable source; and two low-cost drugs, with known toxicity and pharmacokinetics, the isoniazid and hydralazine. In addition, classic reactions in mild conditions were used, and accessible synthetic routes are desired by the pharmaceutical industry, especially when it comes to drugs for the treatment of neglected diseases, such as leishmaniasis. The promising antileishmania activity presented by naphthohydrazones, in association with the synthetic advantages of the route used, make the compounds α HDZ (2), β ACIL (3) and β HDZ (4) suitable for the later stages of drug development.

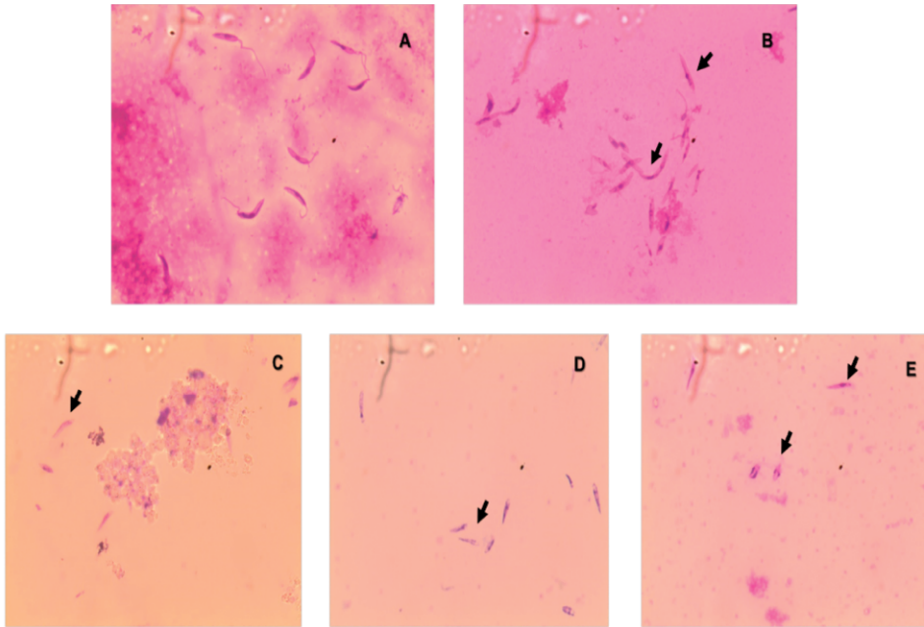


Figure 3. *Leishmania amazonensis* treated with naphthohydrazones in the concentration corresponding to its IC₅₀. (A) without treatment; (B) α HDZ (2); (C) β HDZ (4); (D) α ACIL (1); (E) β ACIL (3). 100x magnification. Arrows represent promastigotes with altered morphology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Coordination for the improvement of Higher Education Personnel (Capes), Foundation of support to science and technology of Pernambuco (Facepe), Federal University of the Valley of the San Francisco (UNIVASF) and Federal University of Piauí (Ufpi).

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

1. P. Gurung, T.D. Kanneganti, Innate immunity against Leishmania infections, *Cell. Microbiol.*, **17**, 1286-1294 (2015).

2. S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, *Lancet*, **392**, 951-970 (2018).
3. M.A. Marlow, M.S. Mattos, M.E. Makowiecky, I. Eger, A.L. Rossetto, E.C. Grisard, M. Steindel, Divergent profile of emerging cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New endemic areas in the Southern frontier, *PLoS One*, **8**, e56177 (2013).
4. M.Z. Handler, P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, R.A. Schwartz, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management, *J. Amer. Acad. Dermat.*, **73**, 911-926 (2015).
5. S. Hendrickx, P. Guerin, G. Caljon, S. Croft, L. Maes, Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges, *Parasitology*, **145**, 453-463 (2016).
6. A. Hefnawy, M. Berg, J.C. Dujardin, G. De Muylder, Exploiting knowledge on Leishmania drug resistance to support the quest for new drugs, *Trends Parasitol.*, **33**, 162-174 (2107).
7. J.R. Coura, S.L. de Castro, A critical review on Chagas disease chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**, 3-24 (2002).
8. N.M.F. Lima, C.S. Correia, L.L. León, G.M.C. Machado, M.F. Madeira, A.E.G. Santana, M.O.F. Goulart, Antileishmanial activity of lapachol analogues, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99**, 757-761 (2004).
9. T.T. Guimarães, M.C.F.R. Pinto, J.S. Lanza, M.N. Melo, R.L. Monte-Neto, I.M.M. Melo, E.B.T. Diogo, V.F. Ferreira, C.A. Camara, W.O. Valença, R.N. Oliveira, F. Frézard, E.N. Silva Júnior, Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *Eur. J. Med. Chem.*, **63**, 523-530 (2013).
10. 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, *Quim. Nova*, **43**, 50-57 (2020).
11. E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Artmed, 3ª ed., Rio de Janeiro, 2014, cap.9.
12. C.R.M. Araújo, C.A. Leite-Filho, V.L.A. Santos, G.L.A. Maia, A.A. Gonsalves, Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de

- química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a fermentação virtual *SciFinder*[®], *Quím. Nova*, **38**, 868-873 (2015).
13. D.G. Guimarães, A.A. Gonsalves, L.A. Rolim, E.C. Araújo, V.L.A. Santos, M.F.S. Silva, F.C.E. Oliveira, M.P. Costa, C. Pessoa, M.O.F. Goulart, T.L. Silva, D.C. Santos, C.R.M. Araújo, Natural naphthoquinones naphthoquinone-based hydrazone hybrids: Synthesis and potent activity against cancer cell lines, *Med. Chem.*, **16**, 1 (2020). DOI: 10.2174/1573406416666200817164308
 14. D.C. Soares, C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, E.A. Saraiva, Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*, *Parasitol. Int.*, **2**, 135-139 (2007).
 15. D.G. Valadares, M.C. Duarte, J.S. Oliveira, M.A. Chávez-Fumagalli, V.T. Martins, L.E. Costa, J.P.V. Leite, M.M. Santoro, W.C.B. Régis, C.A.P. Tavares, E.A.F. Coelho, Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different Leishmania species, *Parasitol. Int.*, **60**, 357-363 (2011).
 16. C.M. Maciel-Rezende, L. Almeida, E.D. Costa, F.R. Pires, K.F. Alves, C. Viegas-Junior, D.F. Dias, A.C. Doriguetto, M.J. Marques, M.H. Santos, Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 3114-3119 (2013).
 17. M.M. Masood, P. Hasan, S. Tabrez, M.B. Ahmad, U. Yadava, C.G. Daniliuc, Y.A. Sonawane, A. Azam, A. Rub, M. Abid, Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and *in silico* physico-chemical properties *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1886-1891 (2017).
 18. N. Arshad, J. Hashim, Irfanullah; M.A. Minhas, J. Aslam, T. Ashraf, S.Z. Hamid, T. Iqbal, S. Javed, New series of 3,5-disubstituted tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazine thione (THTT) derivatives: Synthesis and potent antileishmanial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3251-3254 (2018).
 19. A.F. Arshia, N. Ghouri, K.K.M. Kanwal, S. Perveen, M.I.R. Choudhary, Synthesis of 4-substituted ethers of benzophenone and their antileishmanial activities, *Soc. Open Sci.*, **5**, 171771 (2018).
 20. M. Mohajeri, L. Saghaei, M. Ghanadian, S. Saberi, N. Pestechian, E. Ostadhusseini, Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activities of six quercetin derivatives, *Adv. Biomed. Res.*, **7**, 64 (2018).

21. M. P. Jeremiah, P. Malerich, L. Jinfang Li, D. Joder, E.L.M. Viera, T.S.L. Keesen, R. Vaidyanathan, K.J. Gollob, M.J. Tanga, Antileishmanial activity of natural product-like naphthoquinones, *Drug Dev. Res.*, **74**, 237-241 (2013).
22. C.N. Dias, T.A.L. Nunes, J.M.S. Sousa, L.H. Costa, R.R.L. Rodrigues, A.J. Araújo, J.D.B. Marinho-Filho, M.V. Silva, M.R. Oliveira, F.A.A. Carvalho, K.A.F. Rodrigues, Methyl gallate: Selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects, *Chemico-Biological Interact.*, **320**, 109026 (2020).
23. M. Podinovskaia, A. Descoteaux, Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction, *Future Microbiol.*, **10**, 111-129 (2015).
24. S. Nwaka, A. Hudson, Innovative lead discovery strategies for tropical diseases *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 941-955 (2006).
25. P.H.F. Stroppa, L.M.R. Antinarelli, A.M.L. Carmo, J. Gameiro, E.S. Coimbra, A.D. Da Silva, Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3034-3045 (2017).
26. J.C.F. Rodrigues, J.L.P. Godinho, W. De Souza, *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma Subcellular Biochemistry*, A. Santos, M. Branquinho, C. D'Avila-Levy, L. Kneipp, C. Sodré (eds.), Springer, 2014, cap 1.
27. A.P.R. Gadelha, N.L. Cunha-e-Silva, W. Souza, Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation, *J. Struct. Biol.*, **184**, 280-292 (2013).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

D. Galvão-Guimarães, S. Silva-Simplicio, V. Carlos de Sousa, K.A. da Franca-Rodrigues, F.A.A. Carvalho, S.M.P. Carneiro, M. Pinheiro da Costa, A. de A. Gonsalves, C. Roberta M. Araujo, Synthesis and antileishmanial activity of naphthoquinone-based hybrids, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 505-521 (2021).

Polimedicación, prescripción inapropiada y eventos adversos a fármacos en ancianos hospitalizados: un problema de seguridad del paciente

Ana Virginia Fajreldines^{1a*}, Estefanía Barberis^{1b}, María Belén Beldarraín^{1c}, Mariana Analía Valerio^{2d}, Viviana Rodríguez^{1c}, Marcelo Pellizzari^{2f}

¹Hospital Alemán, Av. Pueyrredón 1640, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

²Hospital Universitario Austral, Av. J. D. Perón 1500, Pilar, Buenos Aires, Argentina.

Correos electrónicos:

^{a*}Autor de correspondencia: fajreldinesa@gmail.com

^bsbarberis@hospitalaleman.com

^cbbeldarraín@hospitalaleman.com

^dmvalerio@cas.austral.edu.ar

^evrodriguez@hospitalaleman.com

^fmpellizzari@cas.austral.edu.ar

Recibido: 21 de enero de 2021

Revisado: 12 de marzo de 2021

Aceptado: 15 de marzo de 2021

RESUMEN

Introducción: la esperanza de vida ha ido en aumento y la posibilidad de padecer una o más patologías crónicas, por ejemplo, diabetes *mellitus*, hipertensión arterial, etc. es alta. La respuesta a los medicamentos en los adultos mayores es marcadamente diferente que en los adultos no ancianos pues se trata de un organismo donde las consecuencias directas del envejecimiento son de relevancia (reducción de la capacidad metabólica del hígado, reducción de la capacidad de filtrado del riñón, hipoclorhidria, entre otros). **Objetivo:** analizar la polifarmacia, la prescripción inapropiada y los eventos adversos en adultos mayores hospitalizados. **Materiales y métodos:** estudio descriptivo de corte transversal. **Resultados:** se estudiaron 318 pacientes. La frecuencia de pacientes polimedcados fue 89% (283). La prescripción inapropiada, 18,9%. Los fármacos mayormente presentes en los esquemas de pacientes polimedcados fueron benzodiazepinas, AINEs, anticoagulantes y antihipertensivos. Los pacientes con eventos adversos han sido 179 (56,3%), de ese porcentaje un 30,2% (54) ha recibido tratamiento con otro medicamento para resolver el evento producido por un medicamento, eso es la llamada cascada de prescripción o de medicamentos. **Conclusiones:** la polimedicación es alta

y causa eventos adversos, es necesario insistir en el trabajo integral para reducir este problema sanitario.

Palabras clave: Polimedicación, ancianos hospitalizados, prescripción inapropiada, eventos adversos a fármacos.

SUMMARY

Polymedication, inappropriate prescription and adverse events to drugs in hospitalized elderly: a patient safety problem

Introduction: life expectancy has been increasing and the possibility of suffering from one or more chronic pathologies, for example, diabetes mellitus, arterial hypertension, etc. is high. The response to medications in older adults is markedly different than in non-elderly adults since it is an organism where the direct consequences of aging are relevant (reduction of the metabolic capacity of the liver, reduction of the filtering capacity of the kidney, hypochlorhydria, among others).

Objective: to analyze polypharmacy, inappropriate prescription, and adverse events in hospitalized older adults. **Materials and methods:** descriptive cross-sectional study. Results: 318 patients were studied. The frequency of polymedicated patients was 89% (283). Inappropriate prescription, 18.9%. The drugs most present in the regimens of polymedicated patients were benzodiazepines, NSAIDs, anticoagulants and antihypertensives. Patients with adverse events have been 179 (56.3%), of that percentage 30.2% (54) have received treatment with another drug to resolve the event produced by a drug, which is the so-called prescription or prescription cascade. **Conclusions:** polypharmacy is high and causes adverse events, it is necessary to insist on comprehensive work to reduce this health problem.

Keywords: Polypharmacy, hospitalized elderly, inappropriate prescription, adverse drug events.

RESUMO

Polimedicação, prescrição inadequada e eventos adversos a medicamentos em idosos hospitalizados: um problema para a segurança do paciente

Introdução: a expectativa de vida vem aumentando e a possibilidade de sofrer de uma ou mais patologias crônicas, como por exemplo, diabetes mellitus, hipertensão

arterial etc. é alta. A resposta aos medicamentos em idosos é marcadamente diferente da de adultos não idosos, pois é um organismo onde as consequências diretas do envelhecimento são relevantes (redução da capacidade metabólica do fígado, redução da capacidade de filtragem do rim, hipocloridria, entre outros). **Objetivo:** analisar polifarmácia, prescrição inadequada e eventos adversos em idosos hospitalizados. **Materiais e métodos:** estudo transversal descritivo. **Resultados:** 318 pacientes foram estudados. A frequência de pacientes polimedicados foi de 89% (283). Prescrição inadequada, 18,9%. Os medicamentos mais presentes nos esquemas dos pacientes polimedicados foram benzodiazepínicos, AINEs, anticoagulantes e anti-hipertensivos. Os pacientes com eventos adversos foram 179 (56,3%), desse percentual 30,2% (54) receberam tratamento com outro medicamento para resolução do evento produzido por um medicamento, que é a chamada prescrição ou receita em cascata. **Conclusões:** a polifarmácia é elevada e causa eventos adversos, é necessário insistir em um trabalho abrangente para reduzir esse problema de saúde.

Palavras-chave: Polifarmácia, idoso hospitalizado, prescrição inadequada, eventos adversos a medicamentos.

INTRODUCCIÓN

La esperanza de vida ha ido en aumento y la posibilidad de padecer una o más patologías crónicas, por ejemplo, diabetes *mellitus*, hipertensión arterial, etc. es alta [1]. La respuesta a los medicamentos en los adultos mayores es marcadamente diferente que en los adultos no ancianos, ya que se trata de un organismo donde las consecuencias directas del envejecimiento son relevantes y es más susceptible a los efectos adversos a fármacos, tanto los efectos que el fármaco produce al organismo como los que el organismo le producen al fármaco están alterados [2].

La polifarmacia se define como la administración concomitante de cuatro o más fármacos, la mayoría de los ancianos requiere varios fármacos para tratar varias enfermedades [3]. La prescripción inapropiada es aquella en la que los riesgos superan a los beneficios cuando hay alternativas más seguras disponibles [4].

El aumento tanto en términos absolutos como relativos de la población anciana junto con la existencia habitual en ellos de pluripatologías (con el consiguiente incremento en el número de fármacos consumidos) hacen que sean cada vez más necesario que las políticas sanitarias y los profesionales resuelvan conjuntamente este tema para revertir la situación grave que se produce actualmente y cuyas consecuencias aún desconocemos

[5]. Así, este estudio se propuso como objetivo caracterizar la polimedición en ancianos hospitalizados.

MÉTODOS

Estudio observacional, de corte transversal, descriptivo. El estudio se llevó a cabo durante el periodo: abril de 2015 a abril 2018, en un hospital de agudos, polivalente de alta complejidad de Argentina. Se incluyeron todos los pacientes de >64 años con cualquier patología, con más de dos días de hospitalización o internados en el periodo del estudio.

La polifarmacia se define como la presencia de cuatro o más medicamentos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [6]. Se utilizó el índice de Charlson para categorizar la carga de enfermedad [7]. Se estudiaron los eventos adversos aparecidos en la hospitalización, el algoritmo de causalidad usado fue el de Naranjo *et al.* [8].

En primer lugar, se consideró pluripatología a la presencia de dos o más cuadros crónicos donde no se puede definir la supremacía de uno sobre otro [9]. Se recogieron además los siguientes datos: edad, sexo, patología de ingreso según ICD-9, presencia de trastorno cognitivo (*Mini-Mental State Examination de Folstein*-MMSE), presencia de médico de cabecera, atención por parte de geriatra con especialización acreditada, presencia de hábitos de automedicación, adherencia al tratamiento previo a la hospitalización, presencia de eventos adversos durante la hospitalización, presencia de prescripción inapropiada según criterios de Beers 2019.

En segundo lugar, se consultó la licencia UpToDate para recabar datos de medicación [10]. Se observó la aparición de eventos adversos durante la hospitalización, sean graves o leves a través de la revisión de las historias clínicas mediante la herramienta *Global Trigger tool del Institute for Healthcare Improvement (IHI)* [11].

Finalmente, el programa SPSS 19, IBM® se usó para el análisis estadístico. Se consideró significancia estadística a $p < 0,05$, IC 95 % y se usó el test χ^2 para variables dicotómicas y una regresión logística binaria cruda y una ajustada para verificar asociación de variables. La variable de ajuste fue la pluripatología. La variable dependiente fue la polifarmacia y las independientes analizadas fueron: edad superior a 79 años, prescripción inapropiada con los criterios de Beers 2019, ausencia de médico de cabecera clínico-geriatra, presencia de trastorno cognitivo, dolor crónico de más de 6 meses de duración, cirugía previa en 12 meses y hospitalización previos (uno o más episodios, en los últimos 12 meses). El presente estudio contó con todas las aprobaciones éticas de la institución del estudio.

RESULTADOS

Se estudiaron todos los pacientes ancianos con prescripción de medicamentos. Los datos fueron recolectados por un farmacéutico y validó una muestra *ad hoc* de un segundo observador, para ello se realizó una prueba de concordancia de obtención de datos con el test de Kappa, se obtuvo un índice Kappa de Cohen de 0,81 (IC 95 % 0,65-0,94), es decir, la concordancia fue muy buena.

Se estudiaron 318 pacientes. La distribución por sexo fue: 176 (55,3 %) varones y 142, (44,7 %) mujeres. La media de edad fue 77,3 \pm 19,5 años. Media de índice de Charlson 4,4 \pm 7,9, rango de medicamentos usados 4-21, mediana 7,17. La frecuencia de pacientes polimedicados fue 89 % (283). Los fármacos mayormente presentes en los esquemas de pacientes polimedicados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Tipos de fármacos incluidos en la polifarmacia.

Tipo de fármaco	Frecuencia en pacientes	Grupo ATC
Antihipertensivos-cardioterapia	97 (34,27 %)	C02A, C03A, C07E
Benzodiacepinas	86 (30,39 %)	N05B
Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	81 (28,61 %)	M01A
Antiarrtrósicos	75(25,50 %)	M01A
Anticoagulantes	73 (25,8 %)	B01A
Antidiabéticos	67 (23,67 %)	A10B
Antidepresivos	63 (22,26 %)	N06A
Otros	56 (19,8 %)	-

Por otro lado, las variables asociadas a la polimedicación se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Variables asociadas a la polimedicación (asociación sin ajuste).

Variable	OR	IC 95 %
Edad superior a 79 años	1,8	1,4-2,5
Sexo femenino	1,9	0,81-3,2 NS
Pluripatología	3,8	1,8-3,9
Índice de Charlson	2,1	1,6-3,1
Ausencia de médico de cabecera	3,5	3,4-3,9
Hospitalización previa (3 meses)	1,2	0,8-1,9 NS
Cirugía previa (12 meses)	0,8	0,5-1,6 NS
Presencia de trastorno cognitivo	2,4	1,5-2,9
Presencia de dolor crónico	2,9	1,8-3,2
Prescripción inapropiada	3,4	1,8-3,8

OR: Odd Ratio. IC 95 %: intervalo de confianza 95 %. NS: no significativo.

En una regresión binaria ajustada por pluripatología, las variables asociadas a la polifarmacia han sido: edad superior a 79 años (OR_{AJ} 1,9), prescripción inapropiada con los criterios de Beers (OR_{AJ} 3,8), ausencia de médico de cabecera clínico-geriatra (OR_{AJ} 2,4) y presencia de trastorno cognitivo (OR_{AJ} 3,1). Las variables dolor crónico, cirugía previa, hospitalización previa no están asociadas a la aparición de eventos adversos en la regresión ajustada por pluripatología.

La prescripción inapropiada con los criterios de Beers 2019 estuvo presente en 18,9 % de los pacientes ($n=60$ pacientes). El número de fármacos inapropiadamente prescritos según Beers fueron 151 (media por paciente: 2,51). Los medicamentos más hallados dentro de Beers fueron: benzodiazepinas (44), antipsicóticos (34), AINEs: 23, anticoagulantes orales (19) y otros (31).

Los pacientes con eventos adversos han sido 179 (56,3 %), de ese porcentaje un 30,2 % (54) ha recibido tratamiento con otro medicamento para resolver el evento originado por el medicamento en cuestión, a eso se le llama cascada de prescripción de medicamentos. La tabla 3 muestra todos los eventos.

Tabla 3. Eventos adversos presentes en los ancianos estudiados.

Eventos	N.º	Porcentaje
Sangrado, melena	33	18,43 %
Somnolencia	15	8,38 %
Insuficiencia renal	24	13,40 %
Aumento de enzimas hepáticas	17	9,5 %
Alergia	6	3,35 %
Depresión respiratoria	24	13,40 %
Confusión	19	10,6 %
Otros	41	22,9 %

DISCUSIÓN

La polimedición es un problema sanitario muy costoso y grave, que debe resolverse con una visión sistémica. No abundan los estudios que hayan caracterizado la polifarmacia y estudiado en la misma población la prescripción inapropiada, los eventos adversos y la cascada de prescripción como problemas asociados. En nuestro estudio más del 80 % de los ancianos analizados presentan polifarmacia, el 18 % de los pacientes presenta prescripción inapropiada según Beers 2019, un 50 % sufre eventos adversos, y de ellos un 30 % recibe un medicamento más para reducir el evento producido por otro

medicamento presente en su esquema farmacológico, como ya se ha mencionado, esto se llama cascada de prescripción [12].

El estudio europeo de Giovannini [13] encontró un 30 % de polimedicación en ancianos internados en geriátricos, si bien, la variable de nuestro estudio es hospitalización, esta variable es mucho mayor, seguramente ello tiene que ver con la pluripatología y la medicación que se adiciona al momento de la hospitalización, justificados por la situación clínica del paciente. Por ejemplo, un paciente ingresado por neumonía bilateral es además hipertenso y diabético insulino-dependiente, entonces en su hoja de prescripción, los tratamientos basales por sus patologías concomitantes seguirán prescriptos, más los antibióticos y broncodilatadores que ameritan el tratamiento de la neumonía.

Un estudio danés [14] incluyó 1 424 775 adultos mayores (mediana de edad 70 años, 53 % mujeres). La mediana de grupos de medicamentos utilizados fue de cinco por persona, algo menor a nuestro estudio. Otro estudio de Etiopía (África) [15] mostró que polifarmacia fue del 24,8 % en pacientes ambulatorios solo con patologías cardiovasculares mientras que los pacientes de edad avanzada (≥ 65 años o más) tenían casi dos veces más probabilidades de sufrir la polifarmacia. Respecto a los países latinoamericanos, por ejemplo, en Brasil [16], se encontró que la prevalencia de al menos un medicamento de uso crónico entre los ancianos fue del 93,0 % y del total de ancianos, 18,0 % usaba al menos cinco medicamentos (polifarmacia), índices menores también a nuestro estudio. Ya se ve que este problema afecta a todas las latitudes.

En otro estudio se halló que los medicamentos antiplaquetarios o anticoagulantes, antidiabéticos, diuréticos y analgésicos son los mayormente prescriptos y el número de enfermedades fue el principal determinante de riesgo de eventos adversos, hallazgos confirmados por nuestro estudio [17].

Schmiedt *et al.* [18] encontraron en su estudio que la utilización de varios medicamentos es un predictor de eventos adversos como la edad avanzada, hallazgos similares a los de nuestro estudio. Indudablemente, el elevado consumo de medicamentos en pacientes ancianos está estrechamente relacionado con la presencia de múltiples dolencias que, generalmente, tienen una mayor expresión clínica a medida que se eleva la cantidad de años vividos, es en este momento donde es mayor la comorbilidad y la discapacidad [18].

Existen estudios que afirman que los mayores consumidores de medicamentos se sitúan en el rango de edad entre 70-79 años [19]. Nuestro estudio halló que estas edades están asociadas a la polifarmacia, con esto se podría inferir que los pacientes de este rango de edad son cada vez más polimeditados por las patologías que en ellos aparecen fruto

del envejecimiento y de múltiples factores ya mencionados, por ello, se debe reducir la polimedición para intentar resolver en gran parte este dilema.

Todos estos factores contribuyen a definir una entidad distinta a la observada en los adultos más jóvenes, que requiere un manejo terapéutico complejo y global, resultado de la valoración geriátrica integral [20], en este sentido nuestro estudio aporta que la ausencia de médico de cabecera clínico o geriatra aumenta la posibilidad de caer en la polimedición y en los eventos adversos.

Según algunos autores, el 80 % de los eventos adversos a medicamentos se consideran prevenibles y están relacionados con la edad, el estado clínico del paciente y el método de administración. Por lo tanto, es importante contar con programas de fármaco-vigilancia en las instituciones de salud para generar información que pueda llevar a estudios de causalidad, para detectar y prevenir estos eventos [21], nuestro estudio utilizó esta recomendación aplicando un método de búsqueda proactiva de eventos adversos.

Las reacciones adversas están facilitadas en geriatría, tanto por las prescripciones inadecuadas como por el aumento del número de fármacos utilizados. Las guías y protocolos de actuación, elaboradas por las sociedades científicas, pueden ser un referente importante respecto a esto. La adhesión del médico a las guías terapéuticas de sociedades científicas ha reducido el número de ingresos y reingresos hospitalarios en la población de mayor edad [22], es necesario trabajar sobre este grupo de profesionales confeccionando y midiendo la adherencia a protocolos sobre la prescripción apropiada de medicamentos en ancianos.

Por otro lado, hay evidencia de que la polifarmacia reduce la adherencia a los tratamientos [2, 20], sin embargo, nuestro estudio no evaluó la adherencia a los tratamientos antes de la hospitalización ni los hábitos de automedicación, propuestas que abren nuevos horizontes para futuras investigaciones y que constituye una debilidad del mismo.

CONCLUSIONES

La polifarmacia es frecuente en población anciana hospitalizada. La edad superior a 79 años, la prescripción inapropiada, la ausencia de médico de cabecera clínico-geriatra y la presencia de trastorno cognitivo son factores que hay que atender para reducir este problema. La prescripción inapropiada según Beers y los eventos adversos se presentan en una buena proporción de pacientes y existe un nuevo problema que se adiciona a la ya alarmante situación, se agregan medicamentos para tratar eventos adversos causados por otros medicamentos, en su lugar, es pertinente el cese de tratamientos inadecuados que causan dichos efectos indeseables. Finalmente, es necesario trabajar intensamente,

con programas de políticas públicas para reducir la magnitud del problema, que según la evidencia mencionada irá en aumento.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Couso-Seoane, *El pensamiento científico y el envejecimiento. Actualización*, Instituto Superior de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, 2006.
2. E.D. Moxey, J.P. Connor, K.D. Novielli, S. Teutsch, D.B. Nash, Prescription drug use in the elderly: a descriptive analysis, *Health Care Finance Review*, **24**(4), 127-141 (2006).
3. N. Fernández-Guerra, N. Díaz-Armesto, B. Pérez-Hernández, A. Rojas-Pérez, Polifarmacia en el anciano, *Revista Acta Médica*, **10**(1-2), (2006).
4. E. Mira y López, *Hacia una vejez joven: psicología y psicoterapia de la ancianidad*, Editorial Kapelur, Buenos Aires, 1961.
5. K.E. Schmader, J.T. Hanlon, P.B. Landsman, G.P. Samsa, I.K. Lewis, M. Weinberger, Inappropriate prescribing and health outcomes in elderly veteran outpatients, *Annals of Pharmacotherapy*, **31**, 529-533 (1997). DOI:10.1177/106002809703100501
6. O. Dalleur, A. Spinewine, S. Henrard, C. Losseau, N. Speybroeck, B. Boland, Inappropriate prescribing and related hospital admissions in frail older persons according to the stop and start criteria, *Drugs & Aging*, **29**(10), 829-837 (2012). DOI:10.1007/s40266-012-0016-1
7. WHO, World Health Organization, URL: <http://www.who.int/polipharmacy-in-elderly/>, consultado el 31 de enero de 2018.
8. M.E. Charlson, P. Pompei, K.L. Ales, A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation, *Journal of Chronic Diseases*, **40**(5), 373-383 (1987). DOI:10.1016/0021-9681(87)90171-8

9. C.A. Naranjo, U. Bustou, E.M. Seleers, *et al.*, A method for estimating the probability of adverse drug reactions, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **30**(2), 239-245 (1981). DOI:10.1038/clpt.1981.154
10. Sociedad Española de Medicina Interna, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria, Federación de Asociaciones de Enfermería Comunitaria y de Atención Primaria, *Desarrollo de guías de práctica clínica en pacientes con comorbilidades y pluripatología*, 2013, URL: http://www.semfyec.es/pfw_files/cma/biblioteca/_DesarrolloGuiasPluripatologia.pdf, consultado el 11 de noviembre de 2018.
11. Uptodate, *Información de mecanismos de acción, dosis y efectos secundarios de fármacos*, URL: <http://www.uptodate.com/contents/search>, visitado el 14 de agosto de 2014.
12. The American Geriatrics Society 2015 Beers Criteria Update Expert Panel, American Geriatrics Society 2015 updated Beers criteria for potentially inappropriate medication use in older adults, *Journal of American Geriatrics Society*, **63**(11), 2227-2246 (2015).
13. S. Giovannini, H.G. van der Roest, A. Carfi, *et al.*, Polypharmacy in home care in Europe: Cross-sectional data from the IBenC study, *Drugs & Aging*, **35**(2), 145-152 (2018). DOI:10.1007/s40266-018-0521-y
14. L.D. Christensen, M. Reiley, G.H. Juul-Larsen, *et al.*, Use of prescription drugs in the older adult population a nationwide pharmacoepidemiological study, *European Journal of Clinical Pharmacology*, **75**(8), 1125-1133 (2019). DOI:10.1007/s00228-019-02669-2
15. Y.G. Tefera, M. Alemayehu, G.B. Mekonnen, Prevalence and determinants of polypharmacy in cardiovascular patients attending outpatient clinic in Ethiopia University Hospital, *PLoS One*, **15**(6), e0234000 (2020). DOI:10.1371/journal.pone.0234000
16. J.M. Ocampo-Chaparro, J.A. Chacón, J.F. Gómez, C.L. Curcio, F.J. Tamayo, Reacciones y eventos adversos por medicamentos en ancianos que consultan un servicio de urgencias, *Colombia Médica*, **39**(2), 135-146 (2008).
17. L.R. Ramos, U.N. Leão-Tavares, A. Dâmaso-Bertoldi, *et al.*, Polypharmacy and polymorbidity in older adults in Brazil: A public health challenge, *Revista de Saúde Pública*, **50**(suppl 2), 9s (2016). DOI:10.1590/S1518-8787.2016050006145.

18. S. Schmiedl, M. Rottenkolber, J. Szymanski, *et al.*, Preventable ADRs leading to hospitalization-results of a long-term prospective safety study with 6,427 ADR cases focusing on elderly patients, *Expert Opinion on Drug Safety*, **17**(2), 125-137 (2018). DOI:10.1080/14740338.2018.1415322
19. A. Todd, A. Husband, I. Andrew, S.A. Pearson, L. Lindsey, H. Holmes, Inappropriate prescribing of preventative medication in patients with life-limiting illness: a systematic review, *BMJ Supportive & Palliative Care*, **7**(2), 113-121 (2017). DOI:10.1136/bmjspcare-2015-000941
20. R. Rodríguez-Duque, G. Jiménez-López, E. Fernández-Manchon, *et al.*, Caracterización de las reacciones adversas medicamentosas en ancianos: Cuba, 2003-2005, *Revista Cubana de Farmacia*, **41**(3), 34-75 (2007).
21. C. Frank, Conscientious family physicians and polypharmacy, *Canadian Family Physician*, **48**, 1418-1420 (2002), URL: <http://www.cfp.ca/cgi/reprint/48/9/1418.pdf>
22. F. Blasco-Patiño, J. Martínez-López de Letona, R. Pérez-Maestu, P. Villares, M.C. Carreño, F. Roman, Estudio piloto sobre consumo de fármacos en ancianos que ingresan en un Hospital, *Anales de Medicina Interna*, **21**(2), 69-71 (2006).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.V. Fajreldines, E. Barberis, M.B. Beldarraín, M.A. Valerio, V. Rodríguez, M. Pellizzari, Polimedición, prescripción inapropiada y eventos adversos a fármacos en ancianos hospitalizados: un problema de seguridad del paciente, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 522-532 (2021).

Avaliação da farmacoterapia no âmbito hospitalar veterinário como ferramenta de promoção na segurança do paciente

Marcelo Rodrigues Martins^{1*}, Karina Barbosa dos Santos², Camylla Alves Silva³,
Fernanda de Siqueira⁴, Ângela Ferreira Lopes⁵, Adilson Donizeti Damasceno⁶

Hospital Veterinário, Universidade Federal de Goiás, Rua 32 Qd A 22 Lt 13 JD. Goiás, Goiânia
Goiás, Brasil.

Correios eletrônicos:

^{1*} Autor para correspondência: farmagyngo@gmail.com

² karinafarma13@gmail.com

³ camylla.as@hotmail.com

⁴ fernandasq@hotmail.com

⁵ angela_lopes@ufg.br

⁶ addamasceno@hotmail.com

Recebido: 12 de setembro de 2020

Revisado: 12 de março de 2021

Aceto: 15 de março de 2021

RESUMO

Introdução: os serviços farmacêuticos contribuem na prevenção e resolução de erros relacionados ao uso de medicamentos. No âmbito veterinário os protocolos relacionados à segurança do paciente, especificamente quanto ao uso seguro e racional de medicamentos não são bem definidos. **Objetivo:** avaliar a farmacoterapia em um hospital veterinário universitário de uma instituição de ensino superior. **Resultados:** verificou-se que no ambiente hospitalar veterinário, existe prescrições de medicamentos inadequados e desnecessários para uso. Bem como a detecção de problemas relacionados a medicamentos do tipo: erros na prescrição, medicamentos não padronizados, doses erradas, duplicidade de terapêuticas e potenciais interações medicamentosas.

Palavras-chave: Cuidados farmacêuticos, farmácia veterinária, prescrição, veterinária, farmácia hospitalar, segurança do paciente.

SUMMARY

Evaluation of pharmacotherapy in the veterinary hospital as a tool to promote patient safety

Introduction: Pharmaceutical services contribute to the prevention and resolution of errors related to the use of medicines. In the veterinary field, protocols related to patient safety, specifically regarding the safe and rational use of medications, are not well defined. **Aim:** To evaluate pharmacotherapy in a university veterinary hospital of a higher education institution. **Results:** It was found that in the veterinary hospital environment, there are prescriptions for inappropriate and unnecessary medications for use. As well as the detection of problems related to medications of the type: errors in prescription, non-standard medications, wrong doses, duplication of therapies and potential drug interactions.

Keywords: Pharmaceutical care, veterinary pharmacy, veterinary, prescription, hospital pharmacy, patient safety.

RESUMEN

Avaliação da farmacoterapia fora do ambiente de hospital veterinário como meio de promover a segurança do paciente

Introducción: los servicios farmacéuticos contribuyen a la prevención y resolución de errores relacionados con el uso de medicamentos. En el campo veterinario, los protocolos relacionados con la seguridad del paciente, específicamente, el uso seguro y racional de los medicamentos no están bien definidos. **Objetivo:** evaluar la farmacoterapia en un hospital veterinario universitario de una institución de educación superior. **Resultados:** se encontró que en el ámbito hospitalario veterinario existen prescripciones de medicamentos inadecuadas e innecesarias para su uso. Así como la detección de problemas relacionados con medicamentos como: errores de prescripción, medicamentos no estándar, dosis incorrectas, duplicación de terapias y posibles interacciones medicamentosas.

Palabras clave: Atención farmacéutica, farmacia veterinaria, prescripción, veterinaria, farmacia hospitalaria, seguridad del paciente.

INTRODUÇÃO

A Organização Pan-Americana da Saúde (2002) preconizou como assistência farmacêutica o conjunto de atitudes, valores éticos, comportamentos, habilidades, compromissos e responsabilidades na prevenção de doenças e promoção à saúde, por meio do uso seguro de medicamentos [1]. Neste sentido, as atividades hospitalares do farmacêutico clínico visam melhorar a eficácia da farmacoterapia, norteando suas ações no uso racional e seguro de medicamentos [2-3]. Uma vez que a intervenção terapêutica no tratamento de enfermidades em ambiente hospitalar apresenta incidência de erros relacionados à prescrição variando de 39 a 74%, o que implica em maior risco de óbito do paciente [4-7].

Na integração com a equipe de saúde, o farmacêutico desenvolve suas ações de forma a contribuir com o uso correto e racional de medicamentos. Um dos métodos empregados nessa prática é o seguimento farmacoterapêutico (SF), que se pauta em um conjunto de intervenções voltadas às necessidades do paciente no concernente ao uso de medicamentos, mediante a detecção de problemas relacionados a medicamentos (PRM) para a prevenção e resolução de resultados negativos associados aos medicamentos (RNM), devendo estas intervenções ser devidamente documentadas [8-10].

A atuação farmacêutica em hospitais veterinários no contexto internacional, tem-se destacado nos países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Oceania, em que a Farmácia Hospitalar Veterinária (FHV) é reconhecida como área de formação profissional. Observa-se que nesses países ofertam serviços estruturados como sistemas de vigilância em saúde com monitoramento de reações adversas a medicamentos no âmbito veterinário [11].

No Brasil, observa-se que as iniciativas para o avanço das atividades de FHV, apesar de incipientes, vem se destacando frente aos países em desenvolvimento, principalmente no que tange sobre o reconhecimento da Farmácia Veterinária como especialidade farmacêutica pelo Conselho Federal de Farmácia (CFF) [11, 12]. No ano seguinte, a publicação da Lei 13.021/2014 do Ministério da Saúde do Brasil (MS) obrigou as farmácias de qualquer natureza ter a responsabilidade e a assistência técnica de farmacêutico habilitado para seu funcionamento [13].

A Resolução 1.015/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária não determina que o farmacêutico seja o responsável técnico pela farmácia de hospitais e clínicas veterinárias [14]. Mas a necessidade de formulações farmacêuticas veterinárias adequadas para cada espécie desencadeia a utilização de medicamentos de uso humano. Diante

disso surgiu a obrigatoriedade da contratação de farmacêuticos para os hospitais veterinários para a comprovação da responsabilidade técnica, este é um pré-requisito para a aquisição de medicamentos de uso humano, principalmente, aqueles descritos na Portaria nº 344/1998 do MS [15]. É importante ressaltar que o profissional que atua nesse seguimento deve ter visão abrangente, voltada para atender as peculiaridades dos animais, de forma a auxiliar no manejo terapêutico destes pacientes, objetivando o melhor desfecho clínico [11].

Segundo estabelecido pelo Terceiro Consenso de Granada, os PRM resultam em RNM e devem ser classificados, conforme os critérios de utilização dos medicamentos, como necessários, efetivos e seguros [11]. Na medicina humana, os protocolos e recomendações de prevenção dos PRM estão bem definidos [16]. O seguimento veterinário no Brasil, por estar vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), não apresenta propostas de execução voltadas à segurança do paciente. No entanto, Martins *et al.* (2017), visando a segurança do paciente veterinário que está submetido a um tratamento farmacológico, realizaram um modelo proposto de prescrição hospitalar voltado para uso no âmbito veterinário [17].

Sendo assim, diante da necessidade de se identificar os PRM durante os cuidados farmacêuticos no ambiente hospitalar veterinário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a farmacoterapia em um hospital veterinário universitário de uma instituição de ensino superior.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional descritivo de coleta transversal e retrospectivo, baseado na revisão de dados disponíveis nos formulários internos da avaliação técnica das prescrições medicamentosas da divisão farmacêutica de um hospital veterinário do Centro-Oeste brasileiro.

O local onde foi desenvolvido este estudo trata-se de um hospital veterinário de ensino universitário, no qual possui a capacidade de internação de 37 cães e gatos nos leitos de enfermaria, clínica geral e especialidades, doenças infectocontagiosas, urgência e emergência. O hospital oferece atendimento nas especialidades de cirurgia geral, cardiologia, dermatologia, odontologia, ortopedia, oncologia, oftalmologia e neurologia.

A divisão de farmácia hospitalar desta instituição conta com a colaboração de 03 farmacêuticos especialistas, no qual realizam o serviço de triagem técnica e avaliação clínica

das prescrições medicamentosas e posteriormente realizam a dispensação dos medicamentos por dose unitarizadas em seringas preenchidas com o medicamento na dose e hora certa a ser administrada pela equipe veterinária.

Todas as prescrições medicamentosas do mês de maio de 2019 foram incluídas neste estudo e enviadas ao serviço de farmácia durante a rotina diária para que fossem triadas e por fim dispensados os medicamentos aos pacientes. Excluiu-se do estudo todas as prescrições que eram destinadas ao recebimento somente de material médico hospitalar. Os dados foram categorizados e analisados e distribuídos por frequência encontrada.

Na tabela 1 está representado o formulário desenvolvido para este estudo que foi utilizado para a coleta de dados. Este por sua vez foi desenvolvido sustentado no Manual de dispensação Farmacêutica 2009, publicado por Iglésias-Ferreira *et al.* (2009) [18] e nos indicadores para avaliação da prescrição publicado no material adaptado por Martins *et al.* (2017) à dispensação hospitalar veterinária [17] que se utilizou de ferramentas do Programa Nacional de Segurança do Paciente do ISMP-Brasil [18].

Tabela 1. Formulário de avaliação do processo de uso do medicamento.

Nome do paciente:		N.º da ficha:		Data:					
Espécie:		Peso:		N.º do dono:					
Medicamento	Dose	Administração		Avaliação do processo de uso					
		Via	Freq*	1	2	3	4	5	6

Legenda: *Freq: Frequência de uso, 1. ¿O medicamento é necessário? 2. ¿O medicamento é adequado? 3. ¿A posologia é adequada? 4. ¿O paciente tem condições de utilizar o medicamento? 5. ¿A farmácia tem condições de fornecer o medicamento? 6. Dados incompletos quanto à concentração, dose, posologia e/ou via de administração. Preencher com S (sim) e N (não).

Os PRM identificados na triagem foram comparados com as informações obtidas nas bases de dados do Micromedex Solutions[®] 2.0, versão utilizada na plataforma Sabiá[®] e o aplicativo Vet Smart[®], versão 2013 atualizado em 2019. Após a determinação dos PRM, procedeu-se a classificação quanto aos critérios de necessidade e efetividade segundo o Terceiro Consenso de Granada [19-20] (tabela 2).

Tabela 2. Classificação do PRM na avaliação da farmacoterapia em um hospital veterinário de ensino.

Classificação do processo de uso	Tipo de PRM
Necessidade	PRM 1: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de não receber um medicamento de que necessita.
	PRM 2: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de receber um medicamento de que não necessita.
Efetividade	PRM 3: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de uma inefetividade não quantitativa do medicamento.
	PRM 4: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de uma inefetividade quantitativa do medicamento.
Segurança*	PRM 5: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de uma insegurança não quantitativa de um medicamento.
	PRM 6: o paciente sofre um problema de saúde em consequência de uma insegurança quantitativa de um medicamento.

Legenda: *Este critério apesar de fazer parte do consenso de Granada, não fez parte do estudo. Devido à inviabilidade de realização do serviço de SF, uma vez que este estudo foi retrospectivo.

Para o processo de discussão foi realizado uma revisão integrativa de estudos de utilização de medicamentos na medicina veterinária nas seguintes bases de dados: PubMed[®], Scientific Eletronic Library on Line (SciELO) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), utilizando-se dos descritores: farmácia veterinária, segurança do paciente, problemas relacionados a medicamentos, avaliação de prescrição, medicamentos veterinários e serviços farmacêuticos.

Este estudo utilizou-se de informações disponíveis nos documentos internos do setor de farmácia do hospital veterinário e não envolveu animais nem seres humanos dessa forma não houve necessidade de aprovação do estudo por comitê de ética em pesquisa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se um total de 188 prescrições de 116 animais, sendo 105 para caninos, 10 para felinos e um para roedor. Um total de 731 medicamentos foram prescritos e, dentre estes, 76,6 % eram analgésicos ou antimicrobianos (tabela 3).

Tabela 3. Caracterização dos medicamentos prescritos aos animais atendidos em um hospital veterinário universitário do Centro-Oeste, Brasil, 2019.

Classe terapêutica	Medicamentos prescritos (n)	Frequência (%)
Analgésico	332	45,4
Antimicrobiano	228	31,2
Antiemético	51	7,0
Suplemento vitamínico	49	6,7
Suplemento alimentar	32	4,4
Anestésico	19	2,6
Inibidor da ECA	14	1,9
Diurético	6	0,8
Total	731	100

Legenda: ECA: enzima conversora da angiotensina.

A via de administração mais frequente nas prescrições foi a via parenteral, apesar de que ao se pensar na segurança do paciente deve-se optar por vias não invasivas, quando existem apresentações farmacêuticas indicadas para a via e que a condição clínica permita [21]. No entanto, no âmbito hospitalar veterinário a preferência pela via parenteral nas prescrições é justificada empiricamente pela praticidade na administração do medicamento, por conta das características do perfil do paciente veterinário como, exigir contenção física, morder ou arranhar inesperadamente [17].

Identificou-se nas prescrições avaliadas que 7,1 % não apresentaram descrito a via de administração do medicamento. Vale ressaltar que informar como deverá ser administrado o medicamento é de suma importância na obtenção da eficácia da terapêutica, uma vez que durante a triagem da prescrição esta informação torna-se essencial para efetividade no processo de dispensação e conseqüentemente na bem como na prevenção de RNM [21].

Partindo-se da premissa de que a prescrição é uma ordem médica ao farmacêutico para a dispensação, ou ao enfermeiro para a administração do medicamento, o fato de 52 prescrições neste estudo não apresentarem a via de administração do medicamento, pode representar um grande risco à segurança do paciente, no que tange à dispensação e administração do medicamento [22-23].

Neste sentido, a inserção da equipe multiprofissional no ambiente hospitalar é uma das formas de se promover a segurança do paciente, sobretudo na medicina veterinária, de forma a evitar tal situação. E ademais, o serviço farmacêutico na avaliação das prescrições é uma das ferramentas da farmácia hospitalar que proporciona formas de se evitar o erro de medicação em até quase 80 % [24-26]. Reis (2013) em seu estudo evidenciou

no serviço de farmácia clínica em um hospital para pacientes humanos, que cerca de 933 intervenções foram realizadas por se detectar prescrições com algum PRM [27].

Nunes (2010) percebeu que a implantação do serviço de farmácia clínica realizado por um farmacêutico dentro do serviço de terapia intensiva de um hospital para humanos, houve uma redução de custos para o hospital de R\$ 50 000,00 no tratamento dos pacientes. Posteriormente, foram contratados mais quatro farmacêuticos por seis meses que resultou na redução dos custos de R\$ 510 000,00. Neste mesmo estudo, notou-se que das 654 notificações de PRM realizadas pelos farmacêuticos do serviço 540 foram consideradas pertinentes e relevantes ao corpo clínico [28].

A posologia é uma informação essencial para que se avalie tecnicamente o uso de mais de um medicamento pelo mesmo paciente, evitando-se assim as potenciais interações medicamentosas (PIM) [17]. Em quase 5% das prescrições avaliadas neste estudo não foi identificada a posologia (tabela 4). Sabe-se que a ausência de posologia pode levar a inefetividade do tratamento por erros de administração de dose ou até mesmo à intoxicação. Gimenes (2010) verificou que cerca de 18% de prescrições sem indicação da posologia [21].

Tabela 4. Avaliação da farmacoterapia dos animais atendidos em um hospital veterinário universitário do Centro-Oeste, Brasil, 2019.

Administração do medicamento prescrito (n.º= 731)		
Via de administração	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Endovenosa	464	63,4
Oral	110	15
Subcutânea	67	9,1
Intramuscular	37	5
Nebulização	1	0,1
Não informado	52	7,1
Posologia	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Dose única	55	7,5
2 em 2 horas	2	0,2
6 em 6 horas	21	2,8
8 em 8 horas	250	34,1
12 em 12 horas	215	29,4
24 em 24 horas	15	20,6
48 horas	1	0,1
Não informado	36	4,9

(*Continúa*)

Avaliação do uso do medicamento (n.º= 731)		
Necessário	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Sim	671	91,8
Não	4	0,5
Sem dados para avaliar*	56	7,7
Adequado	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Sim	669	91,5
Não	62	8,5
Posologia adequada	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Sim	619	84,7
Não	112	15,3
Medicamento não padronizado	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Sim	643	12
Não	88	88
Medicamento sem concentração	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Sim	16	2,2
Não	677	97,8
Problemas relacionados a Medicamentos (PRM) (n.º= 244)		
PRM	Número de medicamentos prescritos	Frequência (%)
Erros na prescrição**	93	38,1
Medicamentos não padronizados	88	36,1
Dose errada do medicamento	41	16,8
PIM***	19	7,8
Duplicidade terapêutica	3	1,2

Legenda: *Não possuía dados clínicos do paciente, como motivo que levou a internação hospitalar. **Não apresentou escrito a concentração do medicamento, dose, posologia ou via de administração do medicamento, ***PIM: potenciais interações medicamentosas.

Neste estudo identificou-se 4 itens medicamentosos considerados como desnecessários ao tratamento, por conter formulação com duplicidade de fármacos. Desta forma, os resultados corroboram para evidenciar que durante a rotina da dispensação hospitalar, a avaliação correta da farmacoterapia por meio da revisão técnica das prescrições medicamentosas é de fundamental importância na identificação de PRM.

Desses 4 itens em duplicidade, descritos acima verificou-se que estes eram medicamentos compostos por polifarmácia administrada com ampola de glicose 50%, e mais dois polivitamínicos que continham também glicose, sacarose na sua composição. Em um estudo conduzido por Reis (2013) no hospital para pacientes humanos de ensino encontrou-se cerca de 19% de medicamentos considerados como desnecessários [27].

O processo de medicação inicia-se com a prescrição médica e que a seleção adequada do medicamento é uma etapa importante da farmacoterapia segura, pois a falha neste processo pode acarretar problemas nas demais etapas [29-30]. Além disso, para a determinação da quantidade de medicamentos prescritos deve-se considerar as necessidades, bem como os potenciais riscos e benefícios da sobreposição de fármacos com igual ação [31-33].

Outra consideração relevante é sobre o número de medicamentos prescritos e a análise do balanço entre potenciais benefícios e riscos em seu uso. A avaliação regular dos esquemas terapêuticos, com foco na adesão, adequação às preferências individuais e identificação de riscos pode minimizar danos e maximizar os benefícios pretendidos [31-33].

Foi evidenciada a prescrição de medicamentos não padronizados e disponíveis para uso, medicamentos não apresentando concentração a serem administradas, posologias inadequadas como dose inferior ou superior ao recomendado como padrão em literatura. A prescrição de medicamentos não padronizados para uso pode influenciar na não adesão terapêutica bem como no atraso e início do tratamento [5,17, 34].

Subtende-se que na elaboração do plano terapêutico o médico veterinário realizou uma decisão fundamentada baseada em evidências científicas. No entanto, antes de realizar a dispensação ou distribuição dos medicamentos é de responsabilidade do farmacêutico do serviço de farmácia hospitalar a triagem técnica e legal da prescrição. E ao se deparar com inconformidades na prescrição, o processo de distribuição e dispensação dos medicamentos, pode sofrer atrasos ou implicar em erros que poderão gerar consequências aos pacientes [5, 34].

Formas alternativas de estratégias para se tornar o uso de medicamentos mais seguros podem ser empregadas durante a prática clínica, como a disponibilização por parte da farmácia ao prescritor de uma lista dos medicamentos disponíveis e padronizados na instituição, informatização da prescrição, programas de educação continuada, etc. [29].

Dos 244 (35%) PRM identificados, erros na prescrição e medicamentos não padronizados representaram 74,2%, seguido de dosagens incorretas e duplicidade na terapêutica. Segundo Martins (2017), os PRM mais frequentes no seguimento hospitalar veterinário são os oriundos de erros na prescrição, tais como ausência de tempo de tratamento, forma farmacêutica, tempo e velocidade de infusão do medicamento, concentração do

fármaco e via de administração [17]. Por sua vez, Reis (2013) encontrou em seu estudo de avaliação de prescrições como PRM mais frequente os erros de dosagens (46,7%) [27].

Toda a cadeia da farmacoterapia é de responsabilidade multidisciplinar e como este se inicia com a prescrição, torna os erros nessa etapa como os mais graves, haja vista que podem refletir em toda a cadeia nas unidades hospitalares, afetando a segurança do paciente por meio dos PRM e ocasionando danos à saúde [30, 35-40].

Dos 244 PRM evidenciados neste estudo, 7,8% representavam PIM, sendo relatadas entre moderada e grave. Reis (2013) em seu estudo evidenciou 7,5% de PIM nas prescrições avaliadas [27]. A relação das PIM encontradas nas prescrições de acordo com a sua intensidade, efeito provocado e conduta sugerida, estão representadas na tabela 5.

Tabela 5. Potenciais interações medicamentosas em prescrições de pacientes internados em um hospital veterinário universitário do Centro-Oeste, Brasil, 2019.

Medicamento	Ação	Descrição da PIM	Intensidade do RNM	Conduta
Benazepril e Espironolactona	Não relatado	Hipercalcemia	Grave	Evitar uso
Sucrafalto e Maltodex	Toxicidade	Aditivo	Moderado	Evitar uso
Fenobarbital e Doxiciclina	Antagonismo	Redução das concentrações plasmáticas de doxiciclina devido ao aumento do metabolismo hepático	Moderado	A dose de doxiciclina deve ser ajustada
Suplemento vitamínico e Ranitidina	Antagonismo	Diminuição da absorção gastrointestinal da vitamina B12	Moderado	Ajustar dose
Dipirona e Butorfanol	Sinergismo	Aditivo	Moderado	Ajustar dose
Dipirona e Furosemida	Antagonismo	Diminuição de ambas as substâncias	Moderado	Monitorar pressão e diurese

Legenda: PIM: potencial interação medicamentosa RNM: reação negativa ao medicamento

Fonte: Micromedex Solutions® 2.0, versão utilizada através da plataforma Sabiá® e o aplicativo Vet Smart® versão, 2013 atualização 2019.

A interação medicamentosa (IM) pode ocorrer em situações de polifarmácia quando os medicamentos são administrados em associação, podendo esta IM variar de insignificante à potencialmente letal [41-42]. Neste estudo detectou-se uma PIM com intensidade grave e que não se recomenda a combinação dos dois medicamentos. No entanto,

é evidente que é necessário não só a identificação de uma PIM. Mas sim a realização do SF, com acompanhamento e monitoramento de exames laboratoriais e clínicos dos pacientes em que se detectou uma PIM, cabendo ao clínico avaliar a necessidade de uso do medicamento.

O âmbito veterinário é escasso de estudos sobre PIM nos pacientes e a maioria das bases de dados disponíveis para pesquisa são relativas a estudos e informações de PIM relatadas em humanos, devendo se considerar a fragilidade das informações obtidas. No entanto, a detecção dessas PIM em uma prescrição já serve de subsídio na triagem da prescrição antes da dispensação e como pré-seleção do paciente para que seja feito a avaliação da farmacoterapia e monitoramento de possíveis aparecimentos de RNM durante o período de internação.

CONCLUSÃO

O presente estudo verificou que no tratamento farmacoterapêutico em um hospital veterinário de ensino, a maioria dos medicamentos prescritos para uso durante o período de internação são analgésicos e antimicrobianos de administração parenteral.

Na avaliação técnica das prescrições sobre uso dos medicamentos, observou-se que apesar de um pequeno percentual, a prescrição de medicamentos considerados pelo critério de triagem como desnecessários e inadequados estiveram presentes. Houve também a detecção de PRM nas prescrições, tais como: erros na prescrição (não apresentou escrito a concentração do medicamento, dose, posologia ou via de administração do medicamento), medicamentos não padronizados para uso na instituição, dose errada do medicamento, PIM e duplicidade terapêutica.

Vale ressaltar que este estudo visou utilizar-se de uma ferramenta de triagem de prescrição, para rastrear e avaliar o processo de uso de medicamentos e identificar PRM. No entanto, durante atividades de serviços clínicos farmacêuticos essas prescrições identificadas com PRM, são selecionadas e o paciente fará parte de outra etapa do serviço não desenvolvido neste estudo que é o seguimento farmacoterapêutico, podendo parte destes PRM identificados nessa primeira avaliação não apresentar significados relevantes.

Sendo assim, as identificações desses PRM neste estudo podem servir de subsídios para implantação de programas de educação continuada direcionadas a prescritores e profissionais da equipe profissional multidisciplinar que atuam na assistência em saúde no âmbito hospitalar veterinário, visando contribuir para o uso correto e seguro de medicamentos durante a farmacoterapia.

CONFLITO DE INTERESSE

Todos os autores relatam que não têm nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. A. Mitsue-Ivama, L. Noblat, M. Silveira de Castro, *et al.*, Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), *Consenso Brasileiro de Atenção Farmacêutica: Proposta*, Brasília D.F., 2002, URL: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/PropostaConsensoAtenfar.pdf>, acessado em 22 de julho de 2020.
2. Sociedade Brasileira de Farmácia Hospitalar (SBRAFH), *Padrões mínimos para farmácia hospitalar*, 3ª ed., Goiânia, 2007, URL: <http://www.sbrafh.org.br/site/public/docs/padroes.pdf>, acessado em 22 de julho de 2020.
3. L. Cardinal, C. Fernandes, Intervenção farmacêutica no processo de validação da prescrição médica, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **5**(2), 14-19 (2014).
4. L.A. Costa, S. Loureiro, M.G.C. Oliveira, Errores de medicación de dos hospitales de Brasil, *Farm. Hosp.*, **30**(4), 235-239 (2006).
5. A.Q. Soares, M.R. Martins, R.F. Carvalho, H.N.C. Cirilo, A.C.F. Modesto, I.P. Duarte, *et al.*, Avaliação das prescrições medicamentosas pediátricas de um hospital de ensino, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **3**(1), 27-31 (2012).
6. T. Maschio de Lima, E. Fazan, L. Pereira, M. de Godoy, Acompanhamento farmacoterapêutico em idosos, *Arq. Ciênc. Saúde*, **23**(1), 52-57 (2016).
7. D. Weber, C.S. Bueno, K.R. Oliveira, Análise das prescrições medicamentosas de um hospital de pequeno porte do noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **33**(1), 139-145 (2012).
8. J. Amaral, M. Valente, H.J. Santos, P. Iglésias, Y. Aguas, F.L. Fernández, Evaluación de la respuesta de los Centros de Información de Medicamentos de Portugal ante un caso clínico de Seguimiento Farmacoterapêutico, *Seguim. Farmacoter.*, **2**(3), 137-152 (2004).
9. M. Machuca, F.L. Fernández, M.J. Faus, *Método Dáder. Manual de Seguimiento Farmacoterapêutico*, Grupo de Investigación em Cuidados Farmacêuticos da Universidade Lusófona – Grupo de Investigación en Atención Farmacêutica (Universidad de Granada), Versão em português (europeu), Lisboa, 2004.

10. Conselho Federal de Farmácia (CFF), *Serviços farmacêuticos diretamente destinados ao paciente, à família e à comunidade: contextualização e arcabouço conceitual*, Brasília, 2016, URL: https://www.cff.org.br/userfiles/Profar_Arcabouco_TELA_FINAL.pdf, acessado em 22 de julho de 2020.
11. SBRAFH, Sociedade Brasileira de Farmácia Hospitalar, *Câmara Técnica: Atuação do farmacêutico hospitalar no âmbito veterinário* [recurso eletrônico], São Paulo, 2019, URL: <http://www.sbrafh.org.br/site/public/temp/5e06484dddade.pdf>, acessado em 13 de março de 2021.
12. Conselho Federal de Farmácia, Resolução nº 572, de 25 de abril de 2013, *Dispõe sobre a regulamentação das especialidades farmacêuticas, por linhas de atuação*, Diário Oficial da União (Brasília), 2013.
13. Brasil, Ministério da Saúde, Lei 13.021 de 08 de agosto de 2014, *Dispõe sobre o exercício e a fiscalização das atividades farmacêuticas*, Diário Oficial da União (Brasília), 11.8.2014 - Edição extra, URL: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13021.htm, acessado em 12 de março de 2021.
14. Conselho Federal de Medicina Veterinária, Resolução nº 1015, de 09 de novembro de 2012, *conceitua e estabelece condições para o funcionamento de estabelecimentos médico-veterinários de atendimento a pequenos animais e dá outras providências*, Diário Oficial da União (Brasília), 31 jan. 2013.
15. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998, *Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial*, Diário Oficial da União (Brasília), 31 dez 1998.
16. D.N. Hernández, M.M.S. Castro, M.J.F. Dáder, *Método Dáder. Manual de Seguimento Farmacoterapêutico*, Edições Universitárias Lusófonas, Lisboa, 2010, URL: http://pharmcare.pt/wp-content/uploads/file/Guia_dader.pdf, acessado em 22 de julho de 2020.
17. M.R. Martins, D.V. Thomaz, R.M. Silvério, T.S. Machado, L.C.D. Zorzin, *et al.*, Avaliação das prescrições medicamentosas de um hospital veterinário: uma contribuição dos serviços clínicos farmacêuticos, *Rev. Biotecn. Ciênc.*, **6**(2), 38-45 (2017).
18. ISMP, Programa Nacional de Segurança do Paciente: Indicadores para avaliação da prescrição, do uso e da administração de medicamentos, *Boletim ISMP, Brasil*, **5**(1), 1-5 (2016). URL: <http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2016/06/Boletim-ISMP-programa-nacional-de-seguran%C3%A7a-do-paciente.pdf>

19. F.P. Iglesias, H.J. Santos, *Manual de dispensação farmacêutica*, Grupo de investigação em cuidados farmacêuticos da Universidade de Lusófoa, Lisboa, 2009.
20. Comitê de Consenso, Tercer Consenso de granada sobre problemas relacionados con medicamentos (PRM) y resultados negativos asociados a la medicación (RNM), *Ars Pharm.*, **48**(1), 5-17 (2007).
21. F.R.E. Gimenes, M.L.S. Mota, T.C.A. Teixeira, A.E.B.C. Silva, S.P. Opitz, S.H. d.B. Cassiani, Patient safety in drug therapy and the influence of the prescription in dose errors, *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, **18**(6), 1055-1061 (2010).
22. F.D. Fuchs, L. Wannmacher, M.B.C. Ferreira, *Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional*, 3ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
23. J.M. Cruciol-Souza, J.C. Thomson, D.G. Catisti, Avaliação de prescrições medicamentosas de um hospital universitário brasileiro, *Rev. Bras. Educ. Méd.*, **32**(2), 188-196 (2008).
24. L.L. Leape, D.J. Cullen, M.D. Clapp, E. Burdick, H.J. Demonaco, J.I. Erickson, *et al.*, Pharmacist participation on physician rounds and adverse drug events in the intensive care unit, *JAMA*, **282**(3), 267-270 (1999). Erratum in: *JAMA*, **283**(10), 1293 (2000).
25. K.K. Scarsi, M.A. Fotis, G.A. Noskin, Pharmacist participation in medical rounds reduces medication errors, *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, **59**(21), 2089-2092 (2002).
26. S.N. Kucukarslan, M. Peters, M. Mlynarek, D.A. Nafziger, Pharmacists on rounding teams reduce preventable adverse drug events in hospital general medicine units, *Arch. Intern. Med.*, **163**(17), 2014-2018 (2003).
27. W.C.T. Reis, C.T. Scopel, C.J. Correr, V.M.S. Andrzejewski, Análise das intervenções de farmacêuticos clínicos em um hospital de ensino terciário do Brasil, *Einstein*, **11**(2), 190-196 (2013).
28. R.M.Z. Nunes, Implantação de Farmácia Clínica na UnimeD de João Pessoa: desafios e resultados, *Meio de Cultura Hospitalar*, **XIII**(44), 26-27 (2010).
29. M.R. Cohen, Causes of medication errors, in: *Medication Errors*, 2nd ed., Chapter 4, 2007, URL: <https://pharmacylibrary.com/doi/book/10.21019/9781582120928>, acessado em 22 de julho de 2020.

30. A.I. Miasso, R.C. de Oliveira, A.E. Bauer de Camargo-Silva, *et al.*, Prescription errors in Brazilian hospitals: a multi-centre exploratory survey, *Cad. Saúde Pública*, **25**(2), 313-320 (2009).
31. C.A. Cadogan, C. Ryan, C.M. Hughes, Appropriate Polypharmacy and medicine safety: when many is not too many, *Drug Saf.*, **39**, 109-116 (2015).
32. B. Guthrie, B. Makubate, V.H. Santiago, T. Dreischulte, The rising tide of polypharmacy and drug-drug interactions: population database analysis 1995–2010, *BMC Med.*, **13**, 74 (2015).
33. R.C.R.M. Nascimento, J. Álvares, A.A.G. Junior, I.C. Gomes, M.R. Silveira, E.A. Costa, *et al.*, Polypharmacy: a challenge for the primary health care of the Brazilian Unified Health System, *Rev. Saúde Pública*, **51**(Supl 2), 19s (2017).
34. Brasil, Ministério da Saúde, *Anexo 03: protocolo de segurança na prescrição, uso e administração de medicamentos*, 2013, URL: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/seguranca-na-prescricao-uso-e-administracao-de-medicamentos>, acessado em 20 de agosto de 2020.
35. A. Bobb, K. Gleason, M. Husch, J. Feinglass, P.R. Yarnold, G.A. Noskin, The epidemiology of prescribing errors: the potential impact of computerized prescribes order entry, *Arch. Intern. Med.*, **164**(7), 785-792 (2004).
36. A.E.B.C. Silva, S.H.B. Cassiani, A prescrição de medicamentos como fonte de erros na medicação, *Rev. Soc. Bras. Clin. Méd.*, **2**(6), 157-164 (2004).
37. T.S. Lesar, L. Briceland, D.S. Stein, Factors related to errors in medication prescribing, *JAMA*, **277**(4), 312-317 (1997).
38. V. Ollivier, C. Thelcide, C. Simon, M. Favier, Standardized order form investigational drugs: effect on completeness of prescription, *Pharm. World Sci.*, **26**(3), 178-179 (2004).
39. E.H. Winslow, V.A. Nestor, S.K. Davidoff, P.G. Thompson, J.C. Borum, Legibility and completeness of physicians' handwritten medication order, *Heart & Lung*, **26**(2), 158-164 (1997).
40. E. Yousif, A.M. Ahmed, M.E. Abdalla, M.A. Abdelgadir, Deficiencies in medical prescriptions in Sudanese hospital, *East Mediterr. Health J.*, **12**(6), 915-918 (2006).

41. K.N. Cedraz, M.C.J. Santos, Identificação e caracterização de interações medicamentosas em prescrições médicas da unidade de terapia intensiva de um hospital público da cidade de Feira de Santana, BA, *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, **12**(2), 1-7 (2014).
42. C.P.S. Crignoli, V.C.M.C. Teixeira, D.C.P. Leal, Interações medicamentosas entre fármacos mais prescritos em unidade de terapia intensiva adulta, *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde*, **7**(2), 26-30 (2016).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

M. Rodrigues-Martins, K. Barbosa dos Santos, C. Alves-Silva, F. de Siqueira, A. Ferreira-Lopes, A. Donizeti-Damasceno, Avaliação da farmacoterapia no âmbito hospitalar veterinário como ferramenta de promoção na segurança do paciente, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(2), 533-549 (2021).

Evaluation of eggshell membrane as an alternative biopolymeric matrix for delivery of nimesulide

Georgetown Almir Oliveira da Silva, Cleônia Roberta Melo Araújo, Arlan de Assis Gonsalves*

Collegiate of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina 56304-97, Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author E-mail address: arlan.gonsalves@univasf.edu.br

Received: October 20, 2020

Corrected: March 15, 2021

Accepted: March 17, 2021

SUMMARY

Introduction: Eggshell membrane (ESM) is a tissue found between the eggshell and the albumen of eggs that has attractive properties for use in drug delivery systems.

Aim: To incorporate in ESM and used it as a model drug in release studies. The color change and FTIR analysis of the biopolymer proved the incorporation of nimesulide in ESM. **Results:** The drug uptake was 176.83 and 122.69 mg g⁻¹ by natural and cross-linked ESM. Release studies were carried out using a spectrophotometric flow system in simulated intestinal fluid pH 7.4. The release profiles showed that after 60 minutes 54.55 and 42.58% of the drug were released from natural and cross-linked ESM, respectively. Kinetics parameters indicated that drug release was better described by the Higuchi model and through a non-Fickian release. **Conclusion:** Considering these results is proved that ESM has the potential to become a polymeric matrix for drug release systems.

Keywords: Nimesulide, biopolymer, cross-linking, release kinetics.

RESUMO

Avaliação da membrana da casca do ovo como uma matriz biopolimérica alternativa para entrega de nimesulida

Introdução: a membrana da casca do ovo (MCO) é um tecido encontrado entre a casca e o albúmen de ovos que possui propriedades atrativas para uso em sistemas

de liberação de fármacos. **Objetivo:** incorporar à MCO e utilizá-la como fármaco modelo em estudos de liberação. Mudança de coloração e análises de FTIR do biopolímero comprovaram a incorporação da nimesulida na MCO. A incorporação do fármaco foi de 176,83 e 122,69 mg g⁻¹ na MCO natural e reticulada, respectivamente. **Resultados:** os estudos de liberação foram realizados usando um sistema de fluxo espectrofotométrico em fluido intestinal simulado pH 7,4. Os perfis de liberação mostraram que após 60 minutos 54,55 e 42,58 % do medicamento foram liberados da MCO natural e reticulada, respectivamente. Os parâmetros cinéticos indicaram que a liberação do fármaco foi mais bem descrita pelo modelo de Higuchi e por meio de uma liberação não Fickiana. **Conclusão:** considerando estes resultados, fica comprovado que a MCO tem potencial para se tornar uma matriz polimérica para sistemas de liberação de fármacos.

Palavras-chave: Nimesulida, biopolímero, reticulação, cinética de liberação.

RESUMEN

Evaluación de la membrana de la cáscara de huevo como una matriz de biopolímero alternativa para la administración de nimesulida

Introducción: la membrana de cáscara de huevo (MCH) es un tejido que se encuentra entre la cáscara de huevo y la albúmina de los huevos que tiene propiedades atractivas para su uso en sistemas de administración de fármacos. **Objetivo:** incorporar en MCH y utilizarla como fármaco modelo en estudios de liberación. El cambio de color y el análisis FTIR del biopolímero demostraron la incorporación de nimesulida en MCH. **Resultados:** la captación del fármaco fue de 176,83 y 122,69 mg g⁻¹ por MCH natural y reticulado. Los estudios de liberación se llevaron a cabo utilizando un sistema de flujo espectrofotométrico en líquido intestinal simulado pH 7,4. Los perfiles de liberación mostraron que después de 60 minutos el 54,55 y el 42,58 % del fármaco se liberó de la MCH natural y reticulada, respectivamente. Los parámetros cinéticos indicaron que la liberación del fármaco se describió mejor mediante el modelo de Higuchi y mediante una liberación no Fickian. **Conclusión:** de acuerdo con estos resultados, el MCH tiene el potencial de convertirse en una matriz polimérica para sistemas de liberación de fármacos.

Palabras clave: Nimesulida, biopolímero, reticulación, cinética de liberación.

INTRODUCTION

The use of drugs that have low aqueous solubility can be result in unsatisfactory treatment for the patient when given orally. In order to overcome this limitation, several drug delivery systems have been developed for improvement of oral absorption and bioavailability of hydrophobic drugs [1].

Polymers have become inevitable excipients in the pharmaceutical preparations because of their versatility. These macromolecules are used for wide purposes, like rate controlling agents, coating agents, binders, disintegrants and targeted delivery [2]. For example, water insoluble polymers can be used in modified drug release dosage forms, like in extended or sustained formulations [3].

Pharmaceutical formulations that act as controlled drug delivery systems requires biodegradable polymers that can be metabolized or excreted by the body as non-toxic compounds [4]. In this way, the study of biopolymers aiming pharmaceutical purposes and others biological applications is an attractive research field.

The eggshell membrane (ESM) is a tissue found between the calcified eggshell and the albumen of eggs. ESM is a natural food by-product from egg processing and is made of thin and highly collagenized fibrous meshworks, with small amounts of carbohydrate and lipids, and with a total thickness of approximately 100 μm [5, 6]. Due to its protein composition, it could be possible to find on the surface of ESM some organic functional groups, such as amine, hydroxyl, carboxylic and carbonyl [7]. The ESM is a biopolymer safe for human consumption and, therefore, this membrane is used as a dietary supplement in nutraceutical treatments because contains glycosaminoglycans and essential proteins, helpful for maintaining healthy joints and connective tissues [8].

ESM has a highly insoluble structure mainly due to irreversible stabilization with lysine-derived desmosine and isodesmosine crosslinkages, similar to those found in collagen and elastin, which reinforce multiple disulfide bonds [6]. Despite the cross-linked fibrous network, this membrane has high biocompatibility, large specific surface area, flexibility in aqueous solution and possesses gas and water permeability [9, 10]. It is such characteristics that encourage researches involving this biomaterial. ESM is being widely used in many fields, such as in cell culture platform [11], wound dressings [12], adsorption of heavy metals and other pollutants [7, 13], platform for electrical devices [14, 15], enzyme, antibody, and nucleic acids immobilization matrix [9, 10, 16] and as a biomaterial in tissue engineering [17]. To our knowledge, there are no reports of incorporation of active compounds (commercial drugs) on this biological membrane for drug delivery studies.

Nimesulide (figure 1) is a non-steroidal anti-inflammatory drug having more affinity to inhibit COX-2 enzyme. It is used to reduce the pain associated with rheumatoid arthritis, and other degenerative joint disorders, dental pain and muscle inflammation. After its oral administration, this drug exhibits a half-life between 1.5 to 4.9 hours, which requires frequent dosing to maintain the ideal plasma concentration for treating inflammatory disorders [18]. In this paper, we study the use of eggshell membrane (ESM), a natural food by-product from egg processing, as an alternative polymeric matrix for drug release systems. The nimesulide was used as a model drug in our release studies. This work shows the incorporation of nimesulide in ESM, the ionic cross-link of this matrix, characterizations of the materials, in vitro drug release studies and application of theoretical kinetic models to the release data.

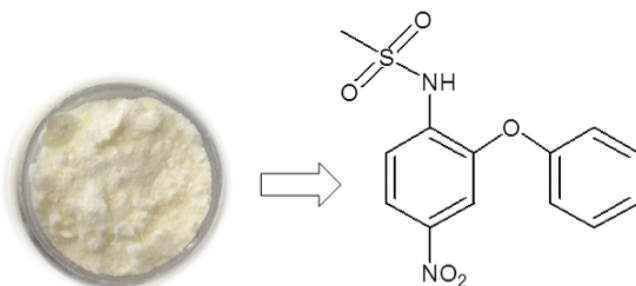


Figure 1. Visual aspect (yellow crystalline powder) and chemical structure of nimesulide.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Nimesulide was obtained by extraction from commercial formulations (100 mg tablets) acquired from a local drugstore. Before its use, the extracted nimesulide was purified by column chromatography and characterized by melting point (145-147 °C), ^1H NMR and ^{13}C NMR analyses, which proved its purity for analytical tests. The chemical name, molar mass, water solubility and pK_a of nimesulide are *N*-(4-nitro-2-phenoxyphenyl) methane sulfonamide, 308.30 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 6.5 [19]. All other reagents used in the experiments were of analytical grade. Aqueous solutions were prepared with deionized water.

Extraction of eggshell membrane

Fresh white chicken eggs (30 units) were treated with 3.0 L of 10.0 % v.v $^{-1}$ H_3CCOOH (acetic acid) for 48 h at room temperature to dissolve the outer layer of the shell and

expose the eggshell membrane (ESM). The turgid eggs were ruptured, and the internal content discarded. The ESM were thoroughly washed with deionized water and dried on a Teflon tray for 48 h at room temperature. The dried ESM were ground in a domestic blender using ethanol 95.0 % v.v⁻¹ as solvent, sieved with a sieve size of 18 mesh (1 mm) to remove small particles, and stored in refrigerator until use. This procedure was an adaptation of the eggshell membrane preparation described by Krishnamoorthy *et al.* (2012) [20] and is based on the acid-base reaction between the CaCO₃ (main component of the eggshell) and the acetic acid.

Drug loading

This experiment was adapted from the drug loading method reported by Gonçalves *et al.* (2005) [21], where the water insoluble biopolymer acts as an adsorbent for the drug. In this procedure, 400 mg of ESM were weighed in an erlenmeyer and immersed in 50.0 mL of 10 g.L⁻¹ nimesulide ethanolic solution at 95.0 % v.v⁻¹ for 48 h at room temperature. The solid samples were filtered, washed with deionized water, dried on a Teflon tray for 48 h at room temperature and stored in a refrigerator until use.

Cross-linking of biopolymer

The cross-linking procedure was carrying out to obtain a biomaterial capable to extend the release of the loaded nimesulide. This experiment was adapted from the ESM mineralization method reported by Wu *et al.* (1995) [22], which consist of a complexation cross-linking of the biopolymer. This complexation process occurs between the positively charged calcium ions (Ca²⁺, a Lewis acid) and the negatively charged carboxylic acid groups (R-COO⁻, a Lewis base), at the ESM surface.

In this procedure, 200 mg of ESM containing nimesulide incorporated were weighed at an erlenmeyer and immersed in 100 mL of 0.01 mol.L⁻¹ HCl containing 10.0 %w.v⁻¹ CaCl₂.2H₂O. The reaction was allowed to proceed for 24 h at room temperature. The solid sample were filtered, washed with deionized water, dried on a Teflon tray for 48 h at room temperature and stored in the refrigerator until use.

Morphological and functional groups analyses

The solid samples (ESM), with and without nimesulide, and with and without cross-linking (CaCl₂), were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM - Vega3 Tescan) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR - Spectrum Two Perkin Elmer).

Quantification of nimesulide

A standard calibration curve of nimesulide was constructed for the spectrophotometric determination of this drug. Initially, a stock solution of nimesulide $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was prepared in 50 mL phosphate buffer pH 7.4 ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Afterwards, nimesulide standard solutions were prepared by appropriate dilutions of the stock solution using the same buffer and containing 0.2 mL of polysorbate 80. The concentration levels of nimesulide ranged from 0.5 to $30.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The standard solutions were analyzed with a spectrophotometer (NI-1600 UV Nova Instruments) at 400 nm using the same buffer as blank solution. The equation calculated by linear regression was $y = 0.04073x - 0.01771$, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9852.

Evaluation of drug loading

To obtain the amount of nimesulide incorporated in the polymeric matrix this drug was extracted from ESM using exhaustive maceration method at room temperature, and methanol-phosphate buffer (pH 7.4 and $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1:1 as solvent. In this procedure, 25 mg of ESM containing nimesulide were weighed in an erlenmeyer and immersed in 8 mL of the extractive solution for 24 h at room temperature. The supernatant solution was carefully collected with a pipette and transferred to a vial keeping the solid inside in the erlenmeyer. This extraction procedure was repeated twice, and the three aliquots of the extractive solutions were transferred to a 25 mL volumetric flask and diluted with deionized water. The concentration of the free drug (in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in the supernatant (extractive solution) was measured with a spectrophotometer at 400 nm using the calibration curve equation. For this quantification, an aliquot of the extractive solution was diluted with the same solution used for the calibration curve construction (phosphate buffer pH 7.4 with polysorbate 80) to ensure that methanol did not compromise the analyses.

The total amount of nimesulide in the extractive solution (in mg) and the drug content in ESM (in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) were calculated. The incorporation efficiency (IE %) of nimesulide in the polymer matrices was calculated, after measurements performed in triplicate, as follows:

$$\text{IE}\% = \frac{\text{Amount of the drug in the polymer (mg)}}{\text{Total initial drug loading (mg)}} \times 100$$

In vitro kinetic release studies

Nimesulide release studies from ESM containing this drug, with and without cross-linking (CaCl_2), were performed using a proposed spectrophotometric flow system that mimics the USP apparatus 4. A spectrophotometer equipped with a 10 mm “U” quartz flow cell was used as a detector in the flow experiments. A magnetic stirrer (NI 1103-E Nova Instruments), peristaltic pump (DMC-100 MS Tecnopon), pump silicon tube (0.2 mm i.d.) and transparent silicon tubes (0.1 mm i.d.) were also used in the proposed flow system. The inlets of the flask were closed with rubber stoppers to prevent the evaporation of the dissolution medium. In addition, to prevent the entry of suspended solids into the flow system, the inlet of the suction tube was coated with a piece of plastic sponge. Figure 2 shows an illustrative scheme of this system.

The dissolution media used for the release studies in sink condition were: i) 100 mL of hydrochloric acid/potassium chloride buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 2.0 to simulate the gastric fluid, and containing 0.2 mL of polysorbate 80); and ii) 100 mL of phosphate buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4 to simulate the intestinal fluid, and containing 0.2 mL of polysorbate 80). These dissolution media were maintained at a controlled temperature of $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (water bath) under magnetic agitation (150 rpm) and a flow rate of $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. After the thermometer recorded $37 \text{ }^\circ\text{C}$, the spectrophotometer was reset at 400 nm with the dissolution medium and 25 mg of the solid sample was inserted into the flask. The absorbance recording was performed from 10 seconds to 60 minutes at predetermined time intervals. The amount of free drug in the dissolution medium was calculated with the calibration curve equation. All drug release tests were performed in triplicate.

Release studies from commercial nimesulide tablets (100 mg) were also carried out using the proposed spectrophotometric flow system. In this procedure, the tablets were previously weighted, and 25 mg of the formulation powder was used in the studies. These formulation samples (25 mg) showed an equivalent mass of nimesulide of $6.07 \pm 0.07 \text{ mg}$. The tests were made under the same experimental conditions as the release studies from ESM. These drug release tests were also performed in triplicate.

It is worth emphasizing that the commercial nimesulide tablets were crushed prior to release studies for: 1) to standardize the release procedure for formulation and ESM biopolymer; 2) to approximate the amounts of nimesulide present in such samples; 3) to adapt the sample mass to the flow release system used in tests, which works on a small scale.

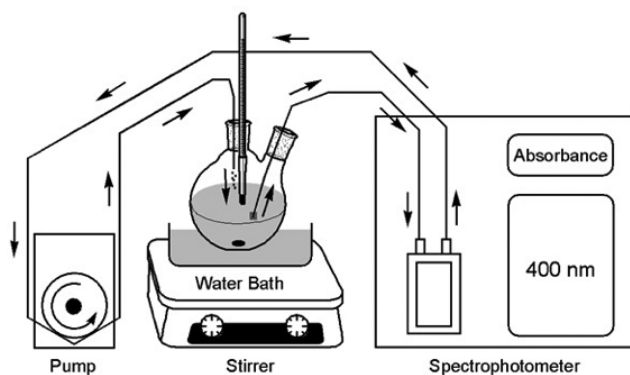


Figure 2. Scheme showing the proposed spectrophotometric flow system used in the nimesulide release studies.

Kinetic drug release models

Parameters of nimesulide release kinetics from ESM containing the loaded drug, with and without cross-linking (CaCl_2), were determined applying the linearized models and considering the entire time interval of the test (0-60 minutes). The fitting parameters and correlation coefficients (R^2) were calculated as follows:

$$\text{Zero-order model: } 1 - \left(\frac{Q_t}{Q_0} \right) = K_0 \cdot t$$

$$\text{First-order model: } \log Q_t = \log Q_0 + \left(\frac{K_1}{2.303} \right) \cdot t$$

$$\text{Higuchi release model: } Q_t = K_H \cdot t^{1/2}$$

$$\text{Peppas model: } \log \left(\frac{Q_t}{Q_0} \right) = \log K_p + n \cdot \log t$$

Where Q_t is the amount (in mg) of drug present in the dissolution medium at time t , Q_0 is the total amount (in mg) of drug present in the solid sample, Q_t/Q_0 is the drug fraction released at time t , K_0 is the zero-order release rate constant, K_1 is the first-order release rate constant, K_H is the Higuchi constant, K_p is the Peppas constant, n is the release exponent (that indicates the mechanism of drug release), and t is the time elapsed in the release study. In the Peppas model, $n = 1$ corresponds to zero-order release kinetics (case-II transport), $0.5 < n < 1$ means a non-Fickian release model (anomalous transport), and $n \leq 0.5$ indicates a Fickian diffusion.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characteristics

After drying, the ESM obtained from chicken eggs acquired the appearance of white fine flakes. This biomaterial was insoluble in aqueous medium and in other organic solvents. An experimental fact that needs to be reported when working with ESM is the difficulty of transforming its shape. This membrane also cannot be solubilized without compromising its biological structure. For this reason, the ESM was used in this work in its solid form (fine flakes). After the nimesulide incorporation and drying of the polymeric matrix, the ESM acquired the appearance of yellow flakes. This color change of the biopolymer is probably due to the natural color of the model drug incorporated (nimesulide).

After drying, the ESM containing nimesulide, and cross-linked with CaCl_2 through ionic interactions, acquired again the white color, but the ESM cross-linked with CaCl_2 was slightly more rigid than the ESM in nature. Despite membrane bleaching after cross-linking, FTIR analysis and release studies proved that drug still remained incorporated into the ESM. The cross-linking procedure was carrying out in acid media ($\text{HCl } 0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) to avoid the alkalization of the Ca^{2+} aqueous solution and the subsequent release of the loaded nimesulide from ESM during this reaction. The figure 3 shows the visible characteristics of these samples.

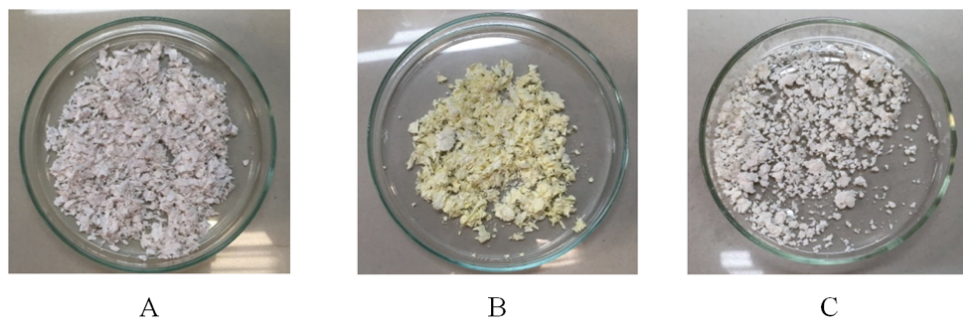


Figure 3. (A). Visible characteristics of natural ESM, (B). ESM containing nimesulide and (C). ESM containing nimesulide and cross-linked with CaCl_2 .

Physicochemical characterization

The microstructure characterization of the polymeric samples was made by Scanning Electron Microscopy (SEM). As can be seen in the SEM image (figure 4A), the ESM is a biopolymeric fibrous net, with its individual fibers randomly oriented, interwoven, and coalescent. This biostructure is similar for that showed by Baláz (2014) [23].

Nimesulide used at this work was also characterized by SEM (figure 4B). The drug, in the solid state, has the aspect of acicular and tabular crystals, a microstructure also described by Sanphui, Sarma e Nangia (2011) [24]. When nimesulide was incorporated into the ESM matrix, the SEM image (figure 4C) shows an apparent thickening of the fibers, a decrease in porosity and the presence of amorphous granules and some crystals, structures which may be the drug adsorbed on the surface. Finally, when the ESM containing nimesulide was cross-linked with CaCl_2 , the SEM image (figure 4D) shows a microstructure with regions where the fibers appear to agglomerate, which may be the result of the cross-linking process.

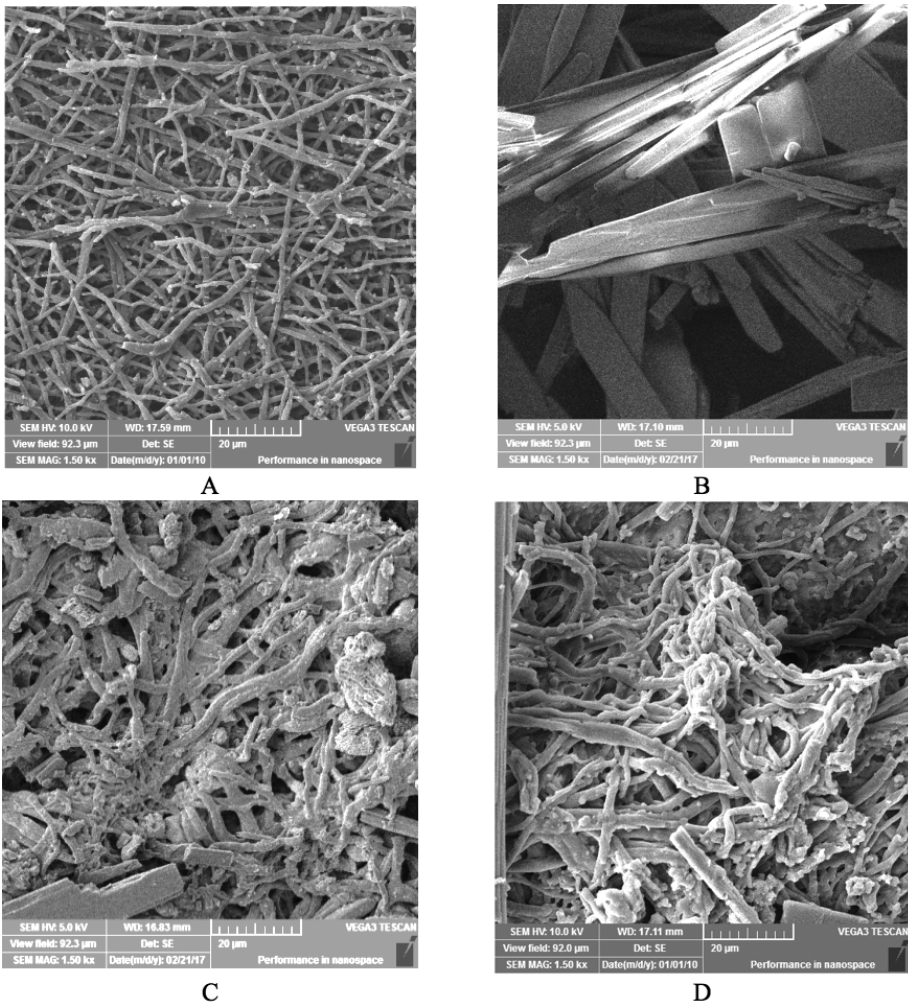


Figure 4. (A). SEM images of ESM in nature, (B). Nimesulide, (C). ESM containing nimesulide and (D). ESM containing nimesulide and cross-linked with CaCl_2 with a magnification of 1500x.

The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to characterize the ESM and nimesulide, individually, and after the incorporation of the model drug in the polymeric matrix, in terms of the presence of some organic functional groups (figure 5).

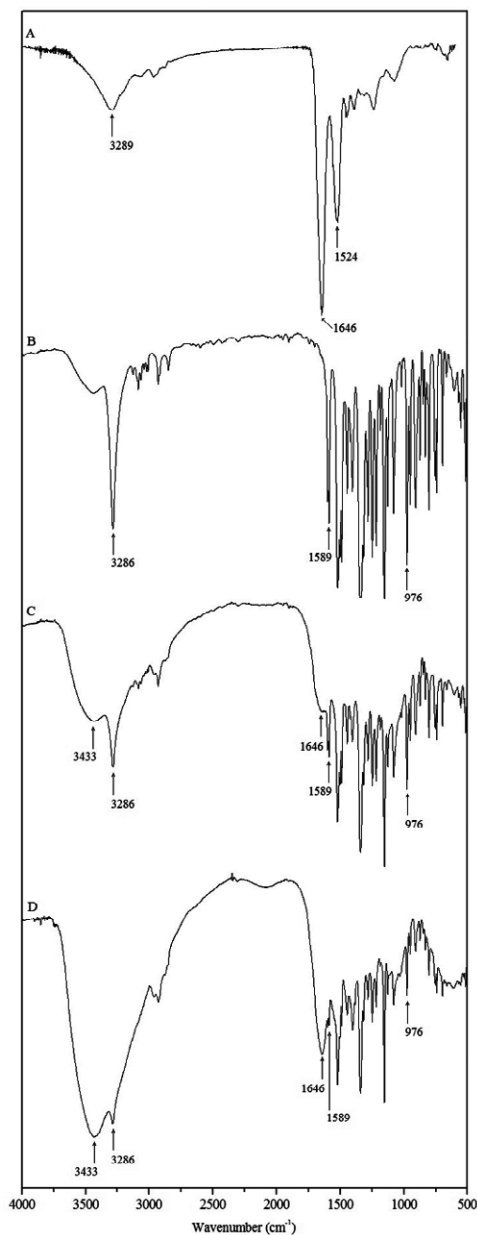


Figure 5. (A). FTIR spectrum of ESM in nature, (B). Nimesulide, (C). ESM containing nimesulide and (D). ESM containing nimesulide and cross-linked with CaCl₂.

The natural ESM FTIR spectrum (figure 5A) shows the presence of peaks (in cm^{-1}) at 3289 (stretching mode of O–H and N–H), 3060, 2932 and 2869 (asymmetric stretching vibrations of the C–H bonds present in =CH and =CH₂ groups), 1646 (C=O stretch of amide), 1524 and 1240 (CN stretching/NH bending modes of amide), 1441 (stretching mode of C=C bond), 1066 (stretching mode of C–O bond) and 660 (stretching mode of C–S bond). These signals are in agreement with the ESM FTIR reported by Baláz (2014) [23] and indicate that this biopolymer has various chemical groups such as amine, amide, carboxyl and hydroxyl groups.

The pure nimesulide FTIR spectrum (figure 5B) shows the presence of characteristic peaks (in cm^{-1}) at 3286 (stretching mode of N–H), 1519 and 1342 (asymmetric and symmetric stretching mode of N–O, respectively), 1589 (stretching mode of N–H from the sulfonamide group), 1249 (asymmetric stretching mode of C–O–C from the ether group), 1154 (symmetric stretching mode of S=O) and 976 (stretching mode of S–O–C bond). Several of these FTIR signals are in agreement with those related by Khan *et al.* (2010-B) [25].

The figure 5C shows the FTIR of the ESM containing nimesulide. In this spectrum some peaks come from the polymer (3289 cm^{-1} and the shoulder at 1646 cm^{-1}) and from the drug (3286, 1589, 1519, 1342, 1154 and 976 cm^{-1}). The signals from ESM at 1646 cm^{-1} (C=O of the amide bond) and from nimesulide at 976 cm^{-1} (S–O of the sulfonamide bond) showed a significant reduction on its intensities, indicating interactions by intermolecular forces, such as hydrogen bonds, between the polymer and the model drug. These results confirm the incorporation of nimesulide in ESM. The broad band at 3433 cm^{-1} belongs to the bending mode of the hydroxyl group of the adsorbed water.

Finally, the figure 5D shows the FTIR spectrum of the ESM containing nimesulide and cross-linked with CaCl₂. In this spectrum also it could be seeing some peaks that come from the polymer (1646 cm^{-1}) and from the drug (shoulder at 3286, 1519, 1342, 1154 and 976 cm^{-1}). These results show that drug remains in the matrix after the cross-linking process. In addition, the broad band at 3433 cm^{-1} became more intense, indicating adsorbed water. This aspect may be due to the complexation process between the calcium ions (Ca²⁺) and carboxylic acid groups (at the ESM surface), which may also require some water molecules as Lewis's base.

Drug content in polymer matrices

The amount of nimesulide incorporated in the polymer matrices was determined by spectrophotometry after the extraction process (exhaustive maceration). The nimesulide drug content in ESM (in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) showed values of $176.83 \pm 13.72 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and 122.69

$\pm 14.86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for natural ESM and cross-linked with CaCl_2 , respectively (table 1). The incorporation efficiency (IE) of nimesulide in the studied polymer matrices (natural ESM and cross-linked with CaCl_2) was low, showed values of $14.14 \pm 1.10 \%$ and $9.82 \pm 1.19 \%$, respectively (table 1). In this work, an adsorption method was used for the drug loading since the ESM is an insoluble matrix and, therefore, makes it difficult to obtain a monolithic system with the drug dispersed in the polymer in a more concentrated and homogeneous way. This is the main reason for the low incorporation efficiency (IE) of the drug in this biomaterial. It is inappropriate to compare the IE obtained in this work, with the IE obtained from other studies involving the incorporation of drugs into polymers using the classical emulsion solvent evaporation method, which is the method most widely used.

Table 1. Amount of nimesulide incorporated in the polymer matrices by the adsorption method.

Polymer matrix	Drug content ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)*	IE %
ESM (natural)	176.83 ± 13.72	14.14 ± 1.10
ESM (cross-linked)	122.69 ± 14.86	9.82 ± 1.19

* Average value \pm standard deviation ($n = 3$).

Although the nimesulide incorporation in the ESM matrices have apparently not showed attractive results, it is important to reinforce that this biopolymer has great potential for use in drug delivery systems owing to its biocompatibility and biodegradability. And, because of this, more studies for pharmaceutical applications with this membrane should be stimulated.

***In vitro* release studies**

Figure 6 shows the *in vitro* release of nimesulide incorporated at the ESM (natural and cross-linked) in sink conditions and at pH 7.4, evaluated using the proposed spectrophotometric flow system method that mimics the USP apparatus 4. The experimental data obtained in these studies were expressed as cumulative concentration and percent release as a function of release time.

Release studies of nimesulide at pH 2.0 (simulated gastric fluid) were also performed for both the matrices (not shown in figure), but in 60 minutes of timespan were not observed significant signals of the drug in dissolution media. These results are explained because nimesulide is a poorly soluble drug in aqueous medium, and at pH 2.0 this drug is not ionized ($\text{pH} < \text{pK}_a$). These two characteristics do not facilitate the release of this drug from the polymer matrix. The release test with the commercial nimesulide formulation also showed similar results.

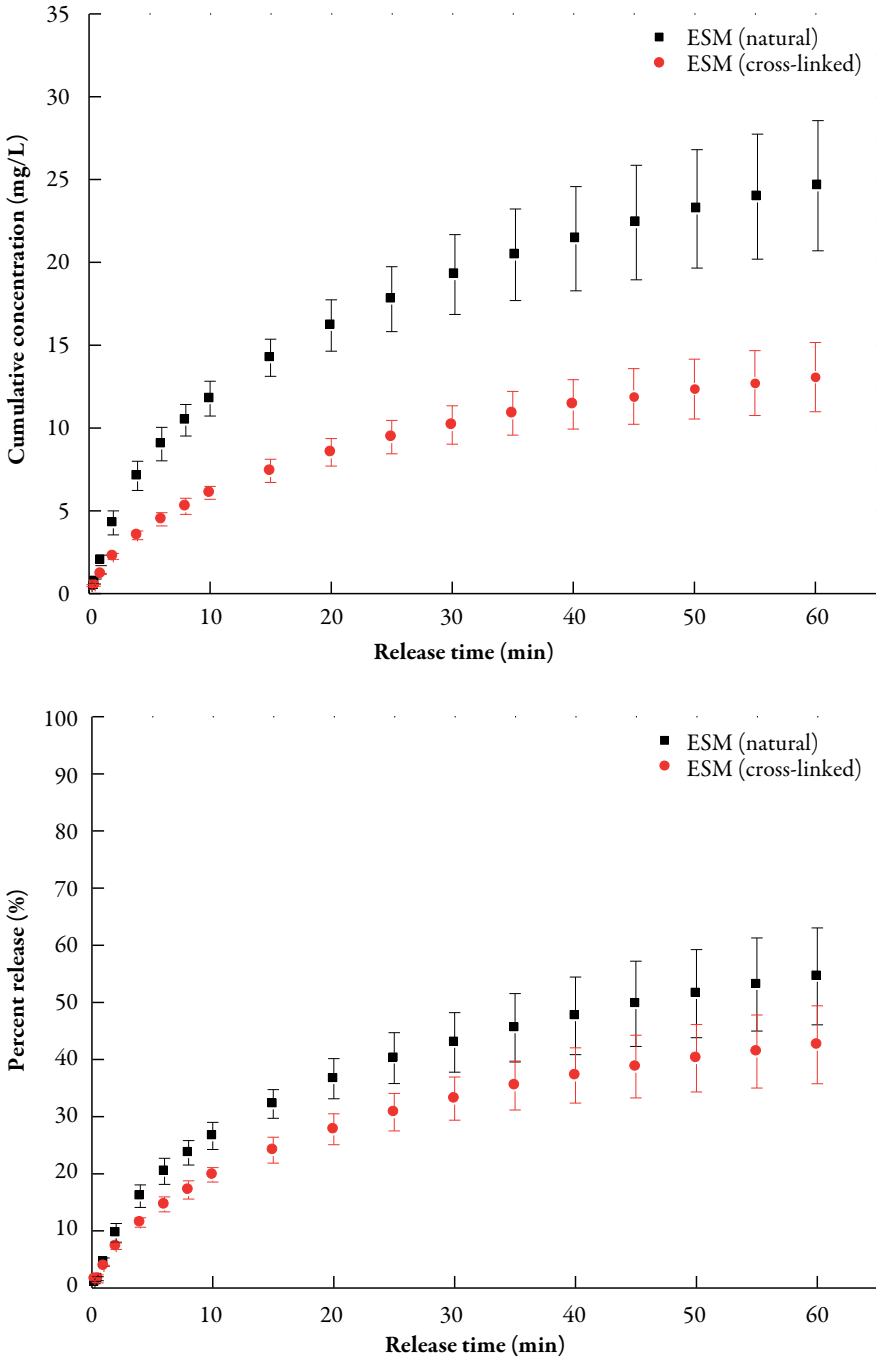


Figure 6. Drug release curves of nimesulide from natural ESM and cross-linked with CaCl_2 in phosphate buffer at pH 7.4 and $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Based on the release curves obtained at pH 7.4 (simulated intestinal fluid) and showed in figure 6, it is possible to detect the presence of a moderate burst effect for both studied matrices in the first 10 minutes of experiments, followed by a gradual release phase. According to Freitas and Marchetti (2005) [26], the burst effect is normally attributed to the presence of the drug near the surface of the polymeric particle, which is known to be permeable to water. As time progress, these particles allow the water diffusion into their core and, consequently, the drug diffuses through the polymer matrix.

The release studies in simulated intestinal fluid showed that 26.63 and 19.81 % of the drug were released from natural ESM and cross-linked, respectively, during the first 10 minutes, and that 54.55 and 42.58 % after 60 minutes. These results are expected for a hydrophobic drug such as nimesulide, which tends to remain entrapped in the hydrophobic zones of the polymer. These results also confirmed that cross-linking with CaCl_2 extended the drug release from the polymer matrices. This is a promising result considering that cross-linking reagent used is safe for human consumption. In addition, the release studies with the commercial nimesulide formulation showed that 27.57 % and 44.77 % of the drug were released in just 1 and 3 minutes, respectively. In this case, a time greater than 3 minutes of release for the commercial nimesulide formulation was not evaluated because the spectrophotometric signal went beyond the maximum monitoring limit, making the drug quantification unfeasible. This rapid release is a common behavior for immediate release dosage forms. A similar behavior was related by Purcaru *et al.* (2010) [27]. In their study nimesulide was released from solid formulations in tween 80 aqueous solutions at different concentrations. In 0.5 % tween 80 solution (in combination with phosphate buffer pH 7.4) nimesulide was immediate released, reaching a value of 70.0 % in the first 10 minutes. Based on the Biopharmaceutical Classification System (BCS), nimesulide is considered a BCS 2 drug (poorly soluble and highly permeable) and, therefore, the dissolution process is the limiting step for its release [27].

The release of drugs that are dispersed in (and not covalently bound to) polymer matrices is dependent on the level of drug loading and the solubility of the drug in the matrix [4]. In this context, in pH 7.4, the release of nimesulide from the ESM matrices is favored because of the deprotonation and ionization of sulfonamide group of this drug ($\text{pH} > \text{pK}_a$). This fact enhances its solubility and favors its dissolution and release process.

In immediate release formulations, such as tablets, all the drugs should be released in less than half an hour, which was not observed in the prepared polymer matrices containing nimesulide (natural and cross-linked ESM) [28]. This behavior makes the ESM

a promising biopolymer that can be used as an alternative excipient in extended-release dosage forms.

For comparative purposes, it is valid to demonstrate other studies related to the release of nimesulide from different polymer matrices. In study of Freitas e Marchetti (2005), the authors prepared microspheres of polylactic acid (PLA-*L*) containing nimesulide to act as a polymeric carrier for this drug [26]. The results indicated that loading efficiency of nimesulide in PLA-*L* microspheres was 70 % using the classical emulsion solvent evaporation method for drug entrapment. The percentage of drug release (in phosphate buffer, pH 7.4) from this matrix was 10.42 % within 60 minutes and 14.22 % after 120 minutes. The obtained results by these researchers showed that developed formulation demonstrated a potential use for sustained release system to vehicle nimesulide.

Raval *et al.* (2010) prepared nimesulide microspheres using Eudragit RS100 and RL100 together, in a single matrix, but at different combinations of these polymers [29]. The authors obtained a drug entrapment varying between 56.36 and 85.36 % through the emulsion solvent evaporation method. The cumulative release of nimesulide (in phosphate buffer, pH 6.8), in the first hour (60 minutes), varied between 6.71 to 27.04 %. These results showed that drug release from microspheres was highly influenced by the combination of Eudragit polymers, and the release profiles showed that a suitable combination of these polymer materials can produce a new matrix for the sustained release of nimesulide.

In 2017, Verma, Mishra and Nayak prepared microspheres of nimesulide, cross-linked with glutaraldehyde, using the coacervation phase separation technique and three different polymeric carriers (gelatin, pectin and sodium alginate) [30]. The drug content for gelatin, pectin and sodium alginate in each microsphere formulations were 80 %, 50 % and 48 %, respectively. When dissolution studies were carried out, in phosphate buffer pH 7.2, the drug release in 60 minutes was 27.2, 19.54 and 37.8 % for gelatin, pectin and sodium alginate microsphere, respectively. The authors developed a sustained release oral product (microspheres) of nimesulide using hydrophilic carriers, but the cross-linking with glutaraldehyde was necessary to sustain the drug release effectively.

Kinetic drug release models

It is known that drug release from polymeric particles is a complex process influenced by many aspects such as polymer swelling and/or erosion, drug diffusion and drug dissolution [31]. In this way, the probably release mechanism of nimesulide from the matrices (ESM in nature and cross-linked) was examined based on the magnitude of

correlation coefficients (R^2) obtained after application of zero-order, first-order, Higuchi and Peppas models. Table 2 shows the kinetics parameters obtained after the application of these theoretical models.

Table 2. Kinetic parameters obtained after the application of linearized theoretical models on the experimental nimesulide release data.

Polymer	Zero-order	First-order	Higuchi	Peppas
ESM (natural)	$R^2 = 0.8775$	$R^2 = 0.9352$	$R^2 = 0.9824$	$R^2 = 0.9501$
		$K_1 = -0.0127$	$KH = 0.3330$	$KP = 0.0414$
		$Q_{0\text{ cal}} = 3.92$		$n = 0.70$
		$Q_{0\text{ exp}} = 4.42$		
ESM (cross-linked)	$R^2 = 0.8986$	$R^2 = 0.9358$	$R^2 = 0.9949$	$R^2 = 0.9750$
		$K_1 = -0.0039$	$KH = 0.1808$	$KP = 0.0393$
		$Q_{0\text{ cal}} = 2.81$		$n = 0.63$
		$Q_{0\text{ exp}} = 3.07$		

The correlation coefficients (R^2) calculated for the polymers tested (natural and cross-linked ESM) (table 2) indicated that nimesulide release was better described by the Higuchi model in both the cases. Results also revealed that polymers tested showed values of n (from the Peppas model) between 0.63 and 0.70, indicating a non-Fickian (anomalous transport) release. These data might indicate that release of nimesulide followed coupled erosion-diffusion mechanism [32]. In other words, both drug diffusion and polymer swelling were important processes for the drug release.

Besides, the kinetic parameters of Higuchi and Peppas models indicate that mechanism of nimesulide release from the polymer matrix apparently was unaffected by the cross-linking of ESM with CaCl_2 .

CONCLUSIONS

The present paper showed the use of eggshell membrane (ESM), a natural food by-product from egg processing, as a biopolymer in drug release studies. FTIR analysis proved the nimesulide incorporation on ESM. Although the drug loading did not show attractive results at these preliminary studies, it is important to reinforce that this biopolymer has potential use in pharmaceutical formulations owing to its biocompatibility and biodegradability. Furthermore, this paper shows an initial study using ESM as an alternative polymeric material for pharmaceutical purposes. The cross-linking of the ESM containing nimesulide using CaCl_2 has been able to extend the release of the

hydrophobic drug, showing itself as a safe reagent for human health. The release studies and the kinetic parameters indicated that release of nimesulide from ESM matrices (natural and cross-linked) followed the Higuchi model and a non-Fickian transport. In view of these results, it could be said that ESM has potential to become a water insoluble carrier for extended release of nimesulide. Further studies should be performed in order to achieve an increase in drug release time from ESM, besides checking stability, toxicity, and the correlation of the *in vitro-in vivo* release profile.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. D. S. C. dos Anjos for her support with the FTIR analyzes at Instituto Federal do Sertão Pernambucano (PE-Brazil).

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare that there are not conflicts of interest.

REFERENCES

1. F.V.S. Rodrigues, L.S. Diniz, R.M.G. Sousa, T.D. Honorato, D.O. Simão, C.R.M. Araújo *et al.*, Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone, *Quím. Nova*, **41**, 756-761 (2018).
2. H.P. Thakkar, J.L. Desai, Influence of excipients on drug absorption via modulation of intestinal transporters activity, *Asian J. Pharm.*, **9**, 69-82 (2015).
3. V.S.V. Priya, H.K. Roy, N. Jyothi, N.L. Prasanthi, Polymers in drug delivery technology, types of polymers and applications, *Scholars Acad. J. Pharm.*, **5**(7), 305-308 (2016).
4. L.M. Orozco-Castellanos, A. Marcos-Fernández, A.J. Alonso-Castro, G. González-García, J.E. Báez-García, J.C. Rivera-Leyva, *et al.*, Hydrocortisone release from tablets based on bioresorbable poly(ether-ester-urethane)s, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **53**(1), e 16144 (2017).
5. H. Jia, K. Saito, W. Aw, S. Takahashi, M. Hanate, Y. Hasebe, *et al.*, Transcriptional profiling in rats and an *ex vivo* analysis implicate novel beneficial function of eggshell membrane in liver fibrosis, *J. Funct. Foods*, **5**(4), 1611-1619 (2013).

6. T.A.E. Ahmed, H.-P. Suso, M.T. Hincke, In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome, *J. Proteom.*, **155**, 49-62 (2017).
7. M.A. Al-Ghouti, M. Khan, Eggshell membrane as a novel bio sorbent for remediation of boron from desalinated water, *J. Environ. Manag.*, **207**, 405-416 (2018).
8. K.J. Ruff, J.R. Endres, A.E. Clewell, J.R. Szabo, A.G. Schauss, Safety evaluation of a natural eggshell membrane-derived product, *Food Chem. Tox.*, **50**, 604-611 (2012).
9. S.F. D'Souza, J. Kumar, S.K. Jha, B.S. Kubal, Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor, *Mater. Sci. Eng. C.*, **33**, 850-854 (2013).
10. P.G. Ray, S. Roy, Eggshell membrane: A natural substrate for immobilization and detection of DNA, *Mater. Sci. Eng. C.*, **59**, 404-410 (2016).
11. Y. Yang, Y. Zhang, W.-J. Li, Y. Jiang, Z. Zhu, H. Hu, *et al.*, Spectraplaklin induces positive feedback between fusogens and the actin cytoskeleton to promote cell-cell fusion, *Dev. Cell.*, **41**, 107-120 (2017).
12. J. Li, D. Zhai, F. Lv, Q. Yu, H. Ma, J. Yin, *et al.*, Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing, *Acta Biomater.*, **36**, 254-266 (2016).
13. M. Baláz, J. Ficeriová, J. Briancin, Influence of milling on the adsorption ability of eggshell waste, *Chemosphere*, **146**, 458-471 (2016).
14. J. Chouler, I. Bentley, F. Vaza, A. O'Feea, P.J. Cameron, M.D. Lorenzo, Exploring the use of cost-effective membrane materials for microbial fuel cell-based sensors, *Electrochim. Acta*, **231**, 319-326 (2017).
15. S.K. Karan, S. Maiti, S. Paria, A. Maitra, S.K. Si, J.K. Kim, New insight towards eggshell membrane as high energy conversion efficient bio-piezoelectric energy harvester, *Mater. Today Energy*, **9**, 114-125 (2018).
16. J. Tang, J. Li, J. Kang, L. Zhong, Y. Zhang, Preliminary studies of application of eggshell membrane as immobilization platform in sandwich immunoassay, *Sens. Actuators B Chem.*, **140**, 200-205 (2009).

17. G.H. Farjah, B. Heshmatian, M. Karimipour, A. Saberi, Using eggshell membrane as nerve guide channels in peripheral nerve regeneration, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **16**(8), 901-905 (2013).
18. S.A. A-Khan, M. Ahmad, M.N. Aamir, G. Murtaza, F. Rasool, M. Akhtar, Study of nimesulide release from ethylcellulose microparticles and drug-polymer compatibility analysis, *Lat. Am. J. Pharm.*, **29**(4), 554-561 (2010).
19. R.M. Shah, D.S. Eldridge, E.A. Palombo, I.H. Harding, Microwave-assisted formulation of solid lipid nanoparticles loaded with non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Int. J. Pharm.*, **515**, 543-554 (2016).
20. V. Krishnamoorthy, Suchandrasen, V.P.R. Prasad, Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of olanzapine-mannitol solid dispersions, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **48**(2), 243-255 (2012).
21. V.L. Gonçalves, M.C.M. Laranjeira, V.T. Fávere, R.C. Pedrosa, Effect of cross-linking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15**(1), 6-12 (2005).
22. T.-M. Wu, J.P. Rodriguez, D.J. Fink, D.A. Carrino, J. Blackwell, A.I. Capalan, *et al.*, Crystallization studies on avian eggshell membranes: Implications for the molecular factors controlling eggshell formation, *Matrix Biol.*, **14**(6), 507-513 (1995).
23. M. Baláz, Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science, *Acta Biomater.*, **10**, 3827-3843 (2014).
24. P. Sanphui, B. Sarma, A. Nangia, Phase transformation in conformational polymorphs of nimesulide, *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2287-2299 (2011).
25. S.A. B-Khan, M. Ahmad, G. Murtaza, M.N. Aamir, N. Rehman, R. Kousar, *et al.*, Formulation of nimesulide floating microparticles using low-viscosity hydroxypropyl methylcellulose, *Trop. J. Pharm. Res.*, **9**(3), 293-299 (2010).
26. M.N. Freitas, J.M. Marchetti, Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases, *Int. J. Pharm.*, **295**, 201-211 (2005).
27. S.-O. Purcaru, M. Ionescu, C. Raneti, V. Anuta, I. Mircioiu, I. Belu, Study of nimesulide release from solid pharmaceutical formulations in tween 80 solutions, *Curr. Health Sci. J.*, **36**(1), 42-47 (2010).

28. E. Palazi, E. Karavas, P. Barmpalexis, M. Kostoglou, S. Nanaki, E. Christodoulou, *et al.*, Melt extrusion process for adjusting drug release of poorly water-soluble drug felodipine using different polymer matrices, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **114**: 332-345 (2018).
29. M.K. Raval, A.A. Bagda, J.M. Patel, J.S. Paun, K.R. Chaudhari, N.R. Sheth, Preparation and evaluation of sustained release nimesulide microspheres using response surface methodology, *J. Pharm. Res.*, **3**(3), 581-586 (2010).
30. G. Verma, M.K. Mishra, K. Nayak, Formulation and evaluation of nimesulide microspheres using different natural carriers, *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.*, **4**(1), 362-365 (2017).
31. N. Coceani, L. Magarotto, D. Ceschia, I. Colombo, M. Grassi, Theoretical and experimental analysis of drug release from an ensemble of polymeric particles containing amorphous and nano-crystalline drug, *Chem. Eng. Sci.*, **71**, 345-355 (2012).
32. Y. Yuan, C. Yinga, Z. Li, Z. Hui-ping, G. Yi-Sha, Z. Bo, *et al.*, Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide, *Int. J. Pharm.*, **430**, 114-119 (2012).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

G.A. Oliveira da Silva, C.R. Melo-Araújo, A. de Assis-Gonsalves, Evaluation of egg-shell membrane as an alternative biopolymeric matrix for delivery of nimesulide, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 550-570 (2021).

Chemical constituents, larvicidal activity and molluscicidal from fresh leaves of *Alpinia zerumbet* (Pers.) and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Paulo Victor Serra Rosa*, Paulo Sérgio Santos Júnior, Irlane Thais Pereira de Sousa, Igor Santos da Silva, Wilma Karlla dos Santos Farias, Laurilene dos Santos Souza, Lauriane dos Santos Souza, Danielly Fonseca, Ari Pereira de Araújo Neto, Gustavo Oliveira Everton

Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV-Ufma), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

* Corresponding author E-mail address: paullovictorserra@gmail.com

Received: September 19, 2020

Corrected: March 15, 2021

Accepted: March 17, 2021

SUMMARY

Introduction: This study evaluated the chemical characterization, larvicidal activity and molluscicidal activity in front of the snail transmitting schistosomes (*Biomphalaria glabrata*) of the essential oils of *Alpinia zerumbet* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. The essential oils (EOs) were extracted by hydrodistillation, with chemical characterization through Gas Chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The physical-chemical parameters were determined according to the Brazilian Pharmacopoeia. The toxicity test followed the bioassay with *Artemia salina* Leach, the EOs approved in this assay followed to evaluate their biological properties. **Methodology:** for molluscicidal activity, the methodology recommended by the WHO was performed, and the LC₅₀ of the EOs was performed for their action in the face of the snail obtained by the Reed&Muench method. Both EOs showed low toxicity, and thus were evaluated for the biological properties larvicidal and molluscicidal. *Alpinia zerumbet* EO showed molluscicidal activity with LC₅₀ of 40.63 mg·L⁻¹ and *Cymbopogon citratus* EO 33.94 mg·L⁻¹. **Results:** Both EOs showed larvicidal and molluscicidal potentials against the organisms tested, showing satisfactory results for their action. The results indicate that the evaluated EOs are composed of substances that promote and encourage their application due to their potential for molluscicidal and larvicidal biological activity.

Keywords: Essential oil, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*.

RESUMEN

Constituyentes químicos, actividad larvica y molusquica de hojas frescas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) y *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Introducción: este estudio evaluó la caracterización química, la actividad larvica y la actividad molusquica frente al caracol que transmite esquistosomas (*Biomphalaria glabrata*) de los aceites esenciales de *Alpinia zerumbet* y *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Los aceites esenciales (AE) fueron extraídos por hidrodestilación, con caracterización química a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los parámetros físico-químicos se determinaron de acuerdo con la Farmacopea Brasileña. La prueba de toxicidad siguió al bioensayo con *Artemia salina* Leach, los AE probados en este ensayo se evaluaron a continuación en sus propiedades biológicas. **Metodología:** para la actividad molusquica se empleó la metodología recomendada por la OMS, y la LC₅₀ de las AE se realizó para su acción frente al caracol obtenido por el método Reed&Muench. Ambos AE mostraron baja toxicidad, y por lo tanto fueron evaluados para las propiedades biológicas larvicidas y molusquicas. *Alpinia zerumbet* AE mostró actividad molusquica con LC₅₀ de 40,63 mg·L⁻¹ y *Cymbopogon citratus* EO 33,94 mg·L⁻¹. **Resultados:** ambos AE mostraron potenciales larvicidas y molusquicas contra los organismos probados, mostrando resultados satisfactorios para su acción. Los resultados indican que los AE evaluados están compuestos de sustancias que promueven y fomentan su aplicación debido a su potencial para la actividad biológica molusquica y larvica.

Palabras clave: Aceite esencial, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*.

RESUMO

Constituintes químicos, atividade larvica e moluscicida de folhas frescas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Introdução: este estudo avaliou a caracterização química, atividade larvica e atividade moluscicida contra o caramujo transmissor de esquistossomos (*Biomphalaria glabrata*) dos óleos essenciais de *Alpinia zerumbet* e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Os óleos essenciais (AE) foram extraídos por hidrodestilação, com caracterização química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

(CG-EM). Os parâmetros físico-químicos foram determinados de acordo com a Farmacopéia Brasileira. O teste de toxicidade seguiu o bioensaio com *Artemia salina* Leach, os EA testados neste teste foram então avaliados quanto às suas propriedades biológicas. **Metodologia:** para a atividade moluscicida, foi utilizada a metodologia recomendada pela OMS, e o LC_{50} do EA foi realizado para sua ação contra o caramujo obtido pelo método de Reed & Muench. Ambos os AE apresentaram baixa toxicidade e, portanto, foram avaliados quanto às propriedades biológicas larvicidas e moluscicidas. *Alpinia zerumbet* AE apresentou atividade moluscicida com CL_{50} de $40,63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e *Cymbopogon citratus* EO $33,94 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. **Resultados:** ambos os AE apresentaram potencial larvicida e moluscicida contra os organismos testados, apresentando resultados satisfatórios para sua ação. Os resultados indicam que os AE avaliados são compostos por substâncias que promovem e estimulam sua aplicação devido ao seu potencial de atividade biológica moluscicida e larvicida.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*.

INTRODUCTION

Essential oils (EOs) constitute the volatile elements contained in various organs of different plants and are thus called due to the lipophilic composition they present, chemically different from the glyceride composition of oils and fats [1]. These EOs are obtained from different extraction techniques, such as distillation which includes steam drag distillation [2].

The use of EOs as medicinal agents has been known since remote antiquity. There are pictorial records of six thousand years ago among the Egyptians. Aromatic substances were also popular in ancient China and India, hundreds of years before the Christian era. However, it was only from the Middle Ages, through the distillation process, introduced by Muslim scientists, that the real commercialization of aromatic materials began [3].

Several studies claim that the use of medicinal plants is related to popular culture which is transmitted from generation to generation in traditional communities [4]. According to Santos *et al.* [5], empirical knowledge is derived from many of the current knowledge of the effects of known plant species. However, it is emphasized that several plants have toxic effects, and that the false idea that everything that is natural is innocuous, needs to be reviewed and made aware [6]. Among several plant species composed of EOs in which these properties can be found are *Alpinia zerumbet*, and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

The species *C. citratus*, also known as lemongrass, belongs to the Gramineae family and is characterized as a perennial herb, with narrow leaves and high commercial value. It has been widely studied as it exhibits antifungal activity [7], antibacterial [8], anthelmintic [9], insecticide [10], diuretic [11] and anticarcinogenic [12], these properties are attributed to volatile oils α -citral, β -citral and mycene [13].

On the other hand, the species *Alpinia zerumbet* (Pers.) is a plant originating in Asia and belongs to the Zingiberaceae family [14]. Among the proven pharmacological properties for *A. zerumbet*, we highlight the hypotensive and diuretic effects obtained through leaf tea, which were confirmed by studies of Mendonça *et al.* [15]. Its classes of chemical constituents, alkaloids, flavonoids, and as main components of the EO are monoterpenes with a higher concentration of 1,8-cineol and terpene-4-ol, with studies proving their antimicrobial activity [16].

Considering that the use of EOs may represent an alternative and innovative way in the control of Neglected Tropical Diseases (NTD), afflicting more than one billion people in 149 tropical and subtropical conditions [17], coma researchers around the world have been studying natural alternatives to synthetic products, since natural products are an option with less toxicity. Thus, this study aimed to determine the chemical constituents, larvicidal activity, molluscicidal and toxicity of the EOs of *A. zerumbet* and *C. citratus*.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The collection of plant material used in this research was carried out in October to December 2019. The leaves of *C. citratus* were collected in the Attic Herbarium Seabra do Maranhão of the Federal University of Maranhão and the leaves of *A. zerumbet* were collected in the municipality of São José de Ribamar, São Luís, Brazil. The samples were deposited in the Attic Seabra Herbarium of the Federal University of Maranhão. After collection, the plant species were transported to the Laboratory of Research and Application of Essential Oils (LOEPAV/Ufma).

Obtaining the EO

For extraction of EOs, the hydrodistillation technique was used with a glass Clevenger extractor coupled to a round bottom balloon packed in an electric blanket as a heat generating source, according to figure 1. 120 g of each plant material were used, adding distilled water (1:10).

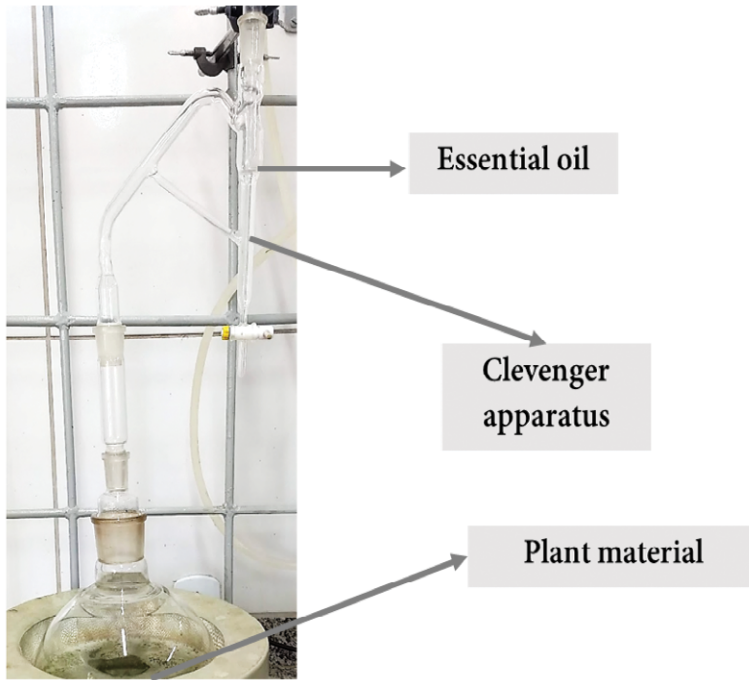


Figure 1. Experimental scheme to obtain the EO.

Hydrodistillation was conducted at 100 °C for 3 h by collecting the extracted EO. Each EO was dried by percolation with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and centrifuged. These operations were performed in triplicates and the samples were stored in amber glass ampoules under 4 °C refrigeration. Subsequently submitted the analyses.

Analyses of chemical constituents

The constituents of the EOs were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS). 1.0 mg of the sample was dissolved in 1000 μL dichloromethane (purity 99.9%). The conditions of analysis were as follows: Method: Adams. M; Volume injected: 0.3 μL ; Column : HP-5MS capillary (5 % diphenyl, 95 % dimethyl polysiloxane) (DB-5MS equivalent or CP-Sil 8CB LB/MS), in dimensions (30 mm x 0.25 mm x 0.25 μm); Drag gas : He (99.9995); 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Injector: 280 °C, Split mode (1:10); Oven: 40 °C (5.0 min.) up to 240 °C at a rate of 4 °C $\cdot\text{min}^{-1}$, from 240 °C to 300 °C (7.5 min) at a rate of 8 °C $\cdot\text{min}^{-1}$; $t\text{T}$ = 60.0 min; Detector : IN; EI (70 eV); Scan mode (0.5 sec scan $^{-1}$); Mass range: 40-500 daltons (one); Transfer line: 280 °C.; Filament: off 0.0 to 4.0 min; Linear quadrupole mass spectrometer. The Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System (AMDIS) program was used to identify the compounds in the sample.

Larvicidal activity

The eggs of *Aedes aegypti* were collected at the Federal University of Maranhão, Bacanga Campus in São Luís/MA, through traps called ovitraps.

These consist of brown buckets (500 mL), polyethylene, with 1 mL of brewer's yeast and 300 mL of running water and inserted two eucatex reeds for mosquito egg position. The traps were inspected weekly for the replacement of reeds and egg collection and forwarded to the Laboratory of Research and Application of Essential Oils (PCQA-Ufma) of the Technological Pavilion of the Federal University of Maranhão (Ufma).

The tests for larvicidal activity were carried out according to the adapted methodology proposed by Silva [18]. Initially, a 100 mg·L⁻¹ mother solution of EO diluted in 2% dimethylsulfoxide solution (DMSO). Five dilutions were prepared from this solution at concentrations 10, 20, 50, 70 and 100 mg·L⁻¹. At each concentration, 10 larvae were added in the proportion 1 mL/larva. All tests were performed in triplicates and as negative control was used a solution formed of DMSO 2%, and as a positive control, a solution of temephos (O,O,O',O'-tetramethyl O,O'-thiodi-p-phenylene bis (phosphothiothioate) at 100 ppm, equivalent to the concentration used by the National Health Foundation (Funasa) for larvicidal vector control, in addition to novaluron (\pm -1-[3-chlorine-4-(1-3-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy) phenyl-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea at 0.02 mg·L⁻¹, a dose adopted by the Ministry of Health, which indicates by the WHO in the range of 0.01 to 0.05 mg·L⁻¹. After 24 hours, the live and dead were found, and the larvae that did not react to the touch after 24 hours of the beginning of the experiment were carried out. To quantify the efficiency of the EO, the Statistical Probit Test was applied [19].

Obtaining and cultivating snails

Samples of snails of the species *Biomphalaria glabrata* were captured in rainy periods, in areas with low sanitation in the neighborhood Sá Viana, São Luís-MA. The collection technique was performed according to a proposal from Brazil (2007) performing a scan with a shell in the submerged areas and the captured snails were collected in a glass container with lid, with water from the breeding site itself. Their search was carried out at various points in each breeding site, and then sent to the molluscum of the Laboratory of Research and Application of Essential Oils (LOEPAV/Ufma).

The snails were kept in the laboratory for 30 days and analyzed every 7 days to confirm the absence of infection by *Schistosoma mansoni*. For this, 5 snails were placed in transparent glass containers with 25 mL of dechlorinated water, that is, 5 mL/snail, exposed to light (60 W lamps) for one hour with a distance of 30 cm to stimulate the release of the feces and taken to be analyzed, through visualization with the aid of a

stereoscopic magnifying glass (8x), those that were parasitized (positive) were labeled and separated for future individual analysis and those who showed no signs of trematoid infection in the period of 30 days were selected for the molluscicidal activity test.

Evaluation of molluscicide activity

For the evaluation of molluscicide activity, the technique recommended by the World Health Organization [20] was used, where two tests were performed in triplicate. In the first, called a pilot test, a solution of the oil under study was prepared in a volume of 500 mL at a concentration of 100 mg·L⁻¹ and 0.15 mL of Tween 80 (active tense), where 10 adult snails were placed, negative for *Schistosoma mansoni*, obtaining at the end a ratio of 50 mL/snail and feeding them with hydroponic lettuce.

They were exposed in the solution for 24 h, at room temperature, removed from the solution, washed twice with dechlorinated water, placed in a glass container containing 500 mL of dechlorinated water, feeding them with hydroponic lettuce and observed to every 24 hours for 4 days to assess mortality.

In the second test, called lethal concentration (LC₅₀), solutions of each oil were prepared in a volume of 500 mL at concentrations 100, 75, 62.5, 50, 20, 10, 5 and 2 mg·L⁻¹ and 0.15 mL of Tween 80 (surfactant), using the same methodology of the pilot test. For the negative control, two tests were also used, in the first we placed 500 mL of dechlorinated water and 10 snails in a glass container and in the second 10 snails immersed in a solution with 0.15 mL of Tween 80 in 500 mL of distilled water, feeding both with hydroponic lettuce and the analysis also performed in the previous tests.

The lethal concentration LC₉₀ of the bioassay was determined by linear regression, obtaining the concentration versus mortality ratio of molluscs. Mortality rates were obtained by averaging dead individuals as a function of the logarithm of the tested dose. The statistical analysis of the data for the LC₅₀ was performed according to the Probit [19].

Toxicity

For the evaluation of the lethality of *Artemia salina* Leach, the methodology described by Meyer *et al.* [21]. *Artemia salina* solution stock of each EO was prepared at the concentration of 10 000 mg·L⁻¹ and 0.02 mg of Tween 80 (active tense). Aliquots of 5, 50 and 500 µL of this were transferred to test tubes and supplemented with saline solution previously prepared up to 5 mL, obtaining at the end concentrations of 10, 100 and 1000 mg·L⁻¹, respectively. All tests were performed in triplicates, where ten larvae in the nauplium phase were transferred to each of the test tubes.

For white, 5 mL of saline solution was used for positive control $K_2Cr_2O_7$ and for negative control 5 mL of a $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ solution of Tween 80. After 24 hours of exposure, the live larvae were counted, considering dead those that did not move during the observation or with the slight agitation of the vial.

The criterion established by Dolabela [22] for classification of the toxicity of EOs, being considered highly toxic when $LC_{50} \leq 80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, moderately toxic to $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \leq LC_{50} \leq 250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and mildly toxic or nontoxic when $LC_{50} \geq 250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical constituents

The chemical constituents were obtained through GC/MS, in the EO samples of the in natura leaves of *C. citratus* and *A. zerumbet*. They were identified in the EO of *C. citratus*, obtained by hydrodistillation, as major constituents: geranial (41.96%) and neral (33.71%). Similar results were found by Antonioni [23] identifying geranial (41.8%) and neral (25.6%). Costa *et al.*[24] also identified geranial geratus (49.98%) in the EO of *C. citratus* and neral (37.78%). Gonçalves *et al.* [25] reported the presence of the major components of the EO of *C. citratus* being geranial (46.32%) and neral (31.28%), equivalent to 77.6% citral. Franz *et al.* [26] observed similar geranial values (47.56%) and neral (31.50%). Sacchetti *et al.* [27] identified in the chemical composition of the EO of this species about 65 to 86% of citral present in the EO, Andrade *et al.* [28] also identified 30.1% of neral and 39.9% of geranial leaves in the EO of *C. citratus* leaves cultivated in northern Brazil. However, Negrelle *et al.* [29] stated that regardless of the origin of lemongrass, The EO has 30 to 93.74% citral, with generally the predominance of geranial.

Thus, it is possible to affirm that citral (neral and geranial) is the major compound for the EO of *C. citratus*, corroborating the results obtained in this study. Studies of the chemical composition of the EO of *C. citratus* in different localities characterize citral as the main chemical constituent of EO. According to Pinto *et al.* [30] citral is a mixture that is a mixture of isomers, geranial (α -citral) and neral (β -citral).

Through CG/MS, the major compounds of the EO of the in natura leaves of *A. zerumbet* were identified as p-cymene (40.15%) and 1.8-cineol (26.70%). Similar results were reported by Castro *et al.* [31] when observing that the EO of the leaves of *A. zerumbet* presented the p-cymene (32.72%), 1.8-cineol (24.05%) and 4-terpineol (20.23%) as the majority, corroborating the analyses of this study. The volatile constituents of the EO of *A. zerumbet* have been the subject of research from several studies,

such as Lahlou *et al.* [32] in which the chemical compounds were identified by the CG-MS method, among the major chemical constituents of the EO, terpinen-4-ol, 1,8-cineol and γ -terpineine stood out. In the study by Barcelos *et al.* [33] terpinen-4-ol monoterpene (37.45 %) was identified and followed by sesquiterpene caryoene oxide (7.56 %) and sabine transhydrate monoterpenes (6.61 %) and 1,8-cineol (4.02 %). Ali *et al.* [34] also detected terpinen-4-ol, 1,8-cineol and β -pineno as the major components of *A. zerumbet* EO.

The major compounds present in the EO of *A. zerumbet* are responsible for several biological effects. Its classes of chemical constituents, alkaloids, flavonoids, and as main components of essential oil are monoterpenes with higher concentration of 1,8-cineol and terpinen-4-ol, with studies proving its antimicrobial activity [35]. The gardener also has anxiolytic, anesthetic action [36], antimicrobial, hypotensive and sedative [37]. It presents anti-inflammatory action was proven by [38]. These effects are fully associated with the majority compounds present in the EO.

Leaf maturation, seasonality, place and time of collection, drying process and storage are factors that influence the quality and composition of EOs [39, 40], which could explain the difference in chemical composition observed in this work with the previously described data. The differences observed in quantity and chemical composition of the EO of plants of the same species in different regions can be caused by microclimatic, phytogeographic, genotypic and geographical and agronomic factors, conditions, mainly in the soil. However, as a general rule, the main components remain the same, varying only their concentration levels [41].

Larvicidal activity

Table 1 presents the results obtained in the lethality assay for the action of EOs in the face of larvae of *Aedes aegypti*.

According to Dias *et al.* [42], larvicidal potential is classified according to criteria based on lethal concentration (LC), EOs that obtain LC_{50} greater than $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ are considered non-active, those who obtain LC_{50} less than $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ are considered active and those who obtain LC_{50} below $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ are highly active. Thus, as observed in table 1, the EO of *A. zerumbet* presented the LC_{50} of $37.96 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, potentially active [43] and LC_{90} of $65.61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ against the larvae *Aedes aegypti*, this result stimulates the potential for applicability of this EO, since Cavalcanti *et al.* [44] when verifying the larvicidal activity of the EO of the leaves and branches of *A. zerumbet* against *Aedes aegypti* found LC_{50} equivalent to $313 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, a value much higher than the LC_{50} of this study [45] when analyzing the larvicidal activity of the EO of the seeds of *A. zerumbet*

front *Aedes aegypti* found LC₅₀ of 125 µg·mL⁻¹, a value also higher than those observed in this study.

Table 1. LC for EOs action against larvae of 4 instar of *Aedes aegypti*.

EO	Concentration (mg·L ⁻¹)	% Mortality	LC ₅₀	LC ₉₀	R ²	σ	χ ²
<i>C. citratus</i>	70	75.00	40.14	71.55	0.9600	0.632	0.967
	50	45.00					
	30	35.00					
	20	10.00					
	10	0.00					
<i>A. zerumbet</i>	70	75.00	37.96	65.61	0.982	0.447	0.997
	50	55.00					
	30	45.00					
	20	25.00					
	10	10.00					
Positive control			All inactive larvae				
Negative control			All active larvae				
White			All active larvae				

As also observed in table 1, the EO of *C. citratus* showed a LC₅₀ of 40.14 mg·L⁻¹ and LC₉₀ of 71.55 mg·L⁻¹ in front of the *Aedes aegypti* larvae, also presenting great potential in their larvicidal activity [43]. Higher concentrations were observed in the study by [46] presenting a LC₅₀ of 63.89 mg·L⁻¹ and LC₉₀ of 112.21 mg·L⁻¹ also for the EO of this species and in other studies the same EO demonstrated relevant results in relation to insecticide activity [47]. The biological activity of *C. citratus* is conventionally attributed to citral, its main component [48].

The active potential of EOs and their compounds against *Aedes aegypti* may vary significantly according to intrinsic and extrinsic factors, plant species, plant part, manufacturing age, chemotypes and geographical conditions (such as occurrence season, precipitation, moisture percentage, temperature, sunlight, and altitude), in which the plant was collected, the source of larvae, and the methods generally used to induce different larval responses [42].

Molluscicidal activity

Table 2 presents the results obtained in the lethality assay for the action of the EOs in the face of adult snails of *Biomphalaria glabrata*.

Table 2. LC para ação do EO frente aos caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*.

EO	Concentration (mg·L ⁻¹)	% Mortality	LC ₅₀	LC ₉₀	R ²	σ	χ ²
<i>C. citratus</i>	150	90	40.63	85.55	0.923	0.406	0.880
	100	90					
	50	50					
	30	20					
	10	10					
<i>A. zerumbet</i>	150	90	33.94	55.60	0.926	0.530	0.934
	100	80					
	50	70					
	30	30					
	10	20					
Positive control			All inactive larvae				
Negative control			All active larvae				
White			All active larvae				

By verifying table 2 we perceived the effectiveness of the species *C. citratus* and *A. zerumbet* in the face of the snail transmitting schistosomosis, since the WHO [49], the molluscicide activity is considered significant when LC₉₀ is less than 100 mg·L⁻¹ [50-53]. In order to be considered molluscicidal the substance must eliminate the snail at all stages of its life cycle and in its natural habitat, have low concentrations, low cost, be stable in storage under tropical conditions; easy to carry and apply; have selective lethal action to snails, be harmless to man, domestic animals, fish and plants, do not suffer decomposition in water and soil and be stable in conditions of temperature and solar irradiation [53].

Studies with EO of *Cymbopogon citratus* leaves also show its effectiveness with the aqueous and alcoholic extract, showing significant results against *Biomphalaria* [54]. The species also exhibits an excellent bactericidal activity in the face of many pathogens, such as *Malassezia* [55]. The EOs do not yet have many studies published in scientific journals with the species or with the extracted oils, showing the relevance of studies with such species. As seen, for the EO of *Cymbopogon citratus*, some studies are reported in relation to other biological activities in scientific journals. The results found in the present work demonstrate that the volatile constituents obtained from plants present molluscicidal activity.

Toxicity

Table 3 presents the results obtained in the lethality assay for the action of the EOs in the face of larvae of *Artemia salina*.

Table 3. LC₅₀ for EO action front *Artemia salina* L.

EO	LC ₅₀	R ²
<i>C. citratus</i>	315.12 ± 6.10 mg·L ⁻¹	0.9942
<i>A. zerumbet</i>	284.15 ± 4.28 mg·L ⁻¹	0.9843

According to table 3, the EO of *C. citratus* presented LC₅₀ equivalent to 315.12 mg·L⁻¹, being classified as nontoxic according to the criterion of [22] that standardizes LC₅₀ ≥ 250 mg·L⁻¹ of the EO as nontoxic. Lima *et al.* [56] evaluated the toxicity of the methanol extract of medicinal plants according to the *A. salina* toxicity bioassay, found LC₅₀ equivalent to 704.67 ± 31.44 µg·mL⁻¹, classifying the methanolic extract of the leaves of *C. citratus* as nontoxic. Divergent results were found by Ribeir *et al.* [57] when analyzing the toxicity of EO *C. citratus* against *A. salina* in the form of a lethal dose (LD₅₀) quantified in 18.85 (µg·mL⁻¹), containing variations in the limits of 13.71 to 26 (µg·mL⁻¹).

Also, according to table 3, EO of *A. zerumbet* presented LC₅₀ of 284.15 mg·L⁻¹ in front of *Artemia salina* larvae, being considered nontoxic by the criterion established by [22]. Similar results were found by dos Santos *et al.* [58] when evaluating the EO toxicity of the leaves of *A. zerumbet* front *A. salina* found the LC₅₀ equal to 280.2 mg·L⁻¹, classifying the EO as nontoxic [59] when analyzing the ethanol extract of leaves and flowers of *A. zerumbet* found a LC₅₀ equal to 740 ppm, being considered toxic by the criteria used by the authors. The extract of *A. zerumbet* showed considerable toxicity at concentrations higher than 800 ppm, with mortality percentage > 63.3% and promoting 100% at concentrations above 1400 ppm. Considering that a plant is toxic when its extract is lethal to at least 50% of *Artemia salina* larvae at a concentration of less than 1000 ppm, it is plausible to state that the ethanol extract of leaves and flowers of *A. zerumbet* presents relevant toxicity, thus showing the EO as an alternative for its application.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (PCQA-Ufma) and Universidade Federal do Maranhão (Ufma).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that there is not conflict of interest.

REFERENCES

1. A. Siani, A. Sampaio, M. Sousa, M. Henriques, M. Ramos, Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório, *Biotecnologia: Ciências e Desenvolvimento*, **16**, 38-46 (2006).
2. F. Solórzano-Santos, M. G. Miranda, Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agentes, *Curret Opinion in Biotechnology*, **23**(2), 136-141 (2012). S.P.D. Cantanhede, A.d.M. Marques, N. Silva-Souza, A.L. Valverde, Atividade molusquicida de plantas: uma alternativa profiática, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**(2), 282-288 (2010).
3. M.H. Tyrrell, Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies, *Food Technology* (Chicago), **44**(1), 68-72 (1990).
4. E.R. Oliveira, L. Menini Neto, Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte-MG, *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, **14**(2), 311-320 (2012).
5. G.G. Santos, R.C. Trindade, J.A.B. Alves, P.O. Santos, P.B. Alves, A.F. Blank, L.M. Carvalho, L.C. Aquino, Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas, *Alimentos e Nutrição Araraquara*, **21**(21), 529-535 (2010).
6. V. O. Bednarczuk, M. C. S. Verdam, M. D. Miguel, O. G. Miguel, Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais, *Visão Acadêmica*, **11**(2), 43-50 (2010).
7. V.J. Schuck, M. Fratini, C.S. Rauber, A. Henriques, E.E. Schapoval, Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*, *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas*, **37**(1), 45-49 (2001).
8. K. Cimanga, K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, A.J. Vlietinck, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**(2), 213-220 (2002).
9. M.D. Almeida, M.B. Botura, M.M. Santos, G.N. Almeida, L.F. Domingues, S.L. Costa, M.J.M. Batatinha, Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capimsanto) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, **12**(3), 125-129 (2003).

10. R. Rajapakase, H.F. Vanenden, Potential of four vegetable oils and ten botanicals' powers for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*, *Journal of Stored Products Research*, **33**(1), 59-68 (1997).
11. J.L. Hernández-Gálvez, I. Paredes-Torres, O.E. Alfonso-Aguilar, M. Llanuch-Lara, Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon cytratus* en modelo de ratas, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **3**(2), 79-82 (1998).
12. R. Puatanachokchai, H. Kishida, A. Denda, N. Murata, Y. Konishi, U. Vinitketkumnun, Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fisher 344 rats, *Cancer Letters*, **183**(1), 9-15 (2002).
13. C. Carriconde, D. Mores, M. Von Fritschen, E.L. Cardozo Junior, *Plantas medicinais e alimentícias*, Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996, p. 45-47.
14. H. Lorenzi, H.M. Souza, *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*, Nova Odessa/SP, Instituto Plantarum, 2001.
15. V.L.M. Mendonça, C.L.A. Oliveira, A.A. Craveiro, V.S. Rao, M.L. Fonteneles, Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **86**, 93-97 (1991).
16. C.P. Victorio, D.S. Alviano, C.S. Alviano, C.L. Lage, Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Buertt & RM Sm. and antimicrobial activity, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**(3), 697-701 (2009).
17. World Health Organization, *Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third – Report on Neglected Tropical Diseases*, WHO library Cataloguing, Geneva, Switzerland, 2015.
18. W. Silva, *Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra Aedes aegypti Linn*, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão-SE, Brasil, 2006.
19. D.J. Finney, *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*, Cambridge University Press, Cambridge, 1952.
20. World Health Organization, *Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides*, TDR/SC, Geneva, 1983.

21. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.J. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica*, **45**(5), 31-34 (1982).
22. M. Dolabela, *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1997.
23. G. Antonioli, *Desenvolvimento de nanocápsulas de poli (ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênico*, Tese de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil, 2020.
24. A.V. Costa, P.F. Rondelli, V.T. de Queiroz, A.C. Tuler, K.B. Britto, D. Pratissolli, *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil on *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Bioscience Journal*, **29**(6), 1840-1847 (2013).
25. A.H. Gonçalves, A.S. Pereira, G.R.S. Santos, L.G.L. Guimarães, Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **17**(4), 1007-1015 (2015).
26. A.R. Franz, N. Knaak, L.M. Fiuza, Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae), *Revista Brasileira de Entomologia*, **55**(1), 116-120 (2011).
27. G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chemistry*, **91**(4), 621-632 (2005).
28. E.H.A. Andrade, M.D.G.B. Zoghbi, M.D.P Lima, Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **12**(1), 41-45 (2009).
29. R.R.B. Negrelle, E.C. Gomes, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **9**, 80-92 (2007).
30. Z.T. Pinto, F.F. Sánchez, A.R.D. Santos, A.C.F. Amaral, J.L.P. Ferreira, J.C. Escalona-Arranz, M.M.D.C. Queiroz, Chemical composition and insecticidal acti-

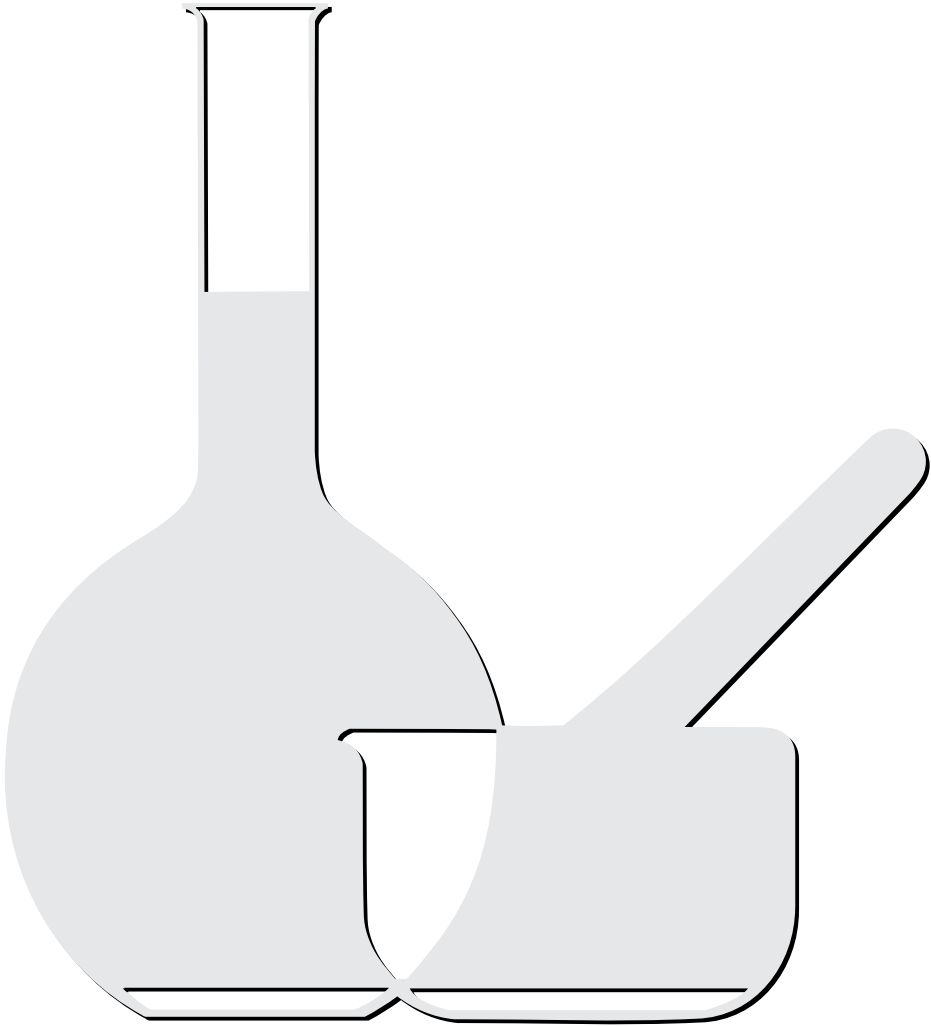
- vity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, **24**(1), 36-44 (2015).
31. K.N.D.C. Castro, D.F. Lima, L.C. Vasconcelos, R.C. Santos, A.M.L. Pereira, F.H.D.S. Fogaça, R.M. Calvet, Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*, *Arquivos do Instituto Biológico*, **83**, e0192014 (2016).
 32. S. Lahlou, L.F.L. Interaminense, J.H. Leal-Cardoso, G.P. Duarte, Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **17**(3), 323-330 (2003).
 33. F.F. Barcelos, M.L. Oliveira, N.P.B. Giovaninni, T.P. Lins, C.A. Filomeno, S.Z. Schneider, T.U. Andrade, Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. em ratos, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **12**(1), 48-56 (2010).
 34. S. Ali, S. Sotheeswaran, M. Tuiwawa, R.M. Smith, Comparison of the composition of the essential oils of *Alpinia* and *Hedychium* species essential oils of Fijian plants, part 1, *Journal of Essential Oil Research*, **14**(6), 409-411 (2002).
 35. C.P. Victório, D.S. Alviano, C.S. Alviano, C.L. Lage, Composição química das frações do óleo foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. e atividade antimicrobiana, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**(3), 697-701 (2009).
 36. E.S.B. Albuquerque, L.J. Neves, Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith (Zingiberaceae), *Acta Botanica Brasileira*, **18**(1), 109-121 (2004).
 37. A.J.C. Correa, C.E. Lima, M.C.C.D. Costa, *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **12**(1), 113-119 (2010).
 38. C. Kriek, T. Finatto, T. S. Müller, M. P. Guerra, A. I. Orth, Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **10**(2), 103-110 (2008).
 39. E.D. Oliveira, O.A. Lameira, M.G.B. Zoghbi, Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **8**(3), 14-23 (2006).

40. M.B. Stefanini, L.C. Ming, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, L.S. Moura, J.A. Marchese, Seed productivity, yield, and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **8**, 86-90 (2006).
41. D. Beatović, D. Krstic-Milosevic, S. Trifunovic, J. Siljegovic, J. Glamoclija, M. Ristic, S. Jelacic, Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia, *Records of Natural Products*, **9**(1), 62-75 (2015).
42. C.N. Dias, D.F.C. Moraes, Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review, *Parasitology Research*, **113**(2), 565-592 (2014).
43. S.S. Cheng, G.G. Huang, Y.J. Chen, J.J. Yu, W.J. Chen, S.T. Chang, Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresource Technology*, **100**(1), 452-456 (2009).
44. E.S.B. Cavalcanti, S.M.D. Morais, 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**(5), 541-544 (2004).
45. E.W. Chan, E.W. Chiang, S.K. Wong, H.T. Chan, *Alpinia zerumbet*, uma planta de gengibre com inúmeras propriedades medicinais: uma atualização sobre os resultados de sua pesquisa, *Chinese Pharmacy*, **26**(11), 775-788 (2017).
46. R.F. Furtado, M.G. de Lima, M. Andrade-Neto, J.N. Bezerra, M.G.D.V. Silva, Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), *Neotropical Entomology*, **34**(5), 843-847 (2005).
47. Z.T. Pinto, *Caracterização química e atividade inseticida dos óleos essenciais de plantas aromáticas procedentes do Brasil e de Cuba sobre o desenvolvimento pós-embriônico de dípteros muscoides*, Ph.D. thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2015.
48. S.Y. Yang, L. Yao, Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* against utilized bacteria and fungus, *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, **4**, 374-376 (2005).
49. Organização Mundial da Saúde, *O controle da esquistossomose: segundo relatório do Comitê de Especialistas da OMS*, Fiocruz, 1994.

50. N. Kumar, P. Bhandari, B. Singh, S.S. Bari, Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*, *Food and Chemical Toxicology*, **47**(2), 361-367 (2009).
51. G. Yang, L. Kong, W. Zhao, X. Wan, Y. Zhai, L.C. Chen, J.P. Koplan, Emergence of chronic non-communicable diseases in China, *The Lancet*, **372**(9650), 1697-1705 (2008).
52. M. Cuenot, Classificazione internazionale del funzionamento, della disabilità e della salute, *EMC-Medicina Riabilitativa*, **25**(1), 1-6 (2008).
53. B. Otarigho, O.A. Morenikeji, Molluscicidal effects of aqueous and ethanolic extracts of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaf against the different developmental stages of *Biomphalaria pfeifferi*, *New York Science Journal*, **5**(8), 70-77 (2012).
54. World Health Organization, *Control de la esquistosomiasis: informe de un Comité de Expertos de la OMS*, TDR/SC, Geneva, 1985.
55. S. Prakash, R. Ramasubburayan, V.S. Ramkumar, E. Kannapiran, A. Palavesam, G. Immanuel, *in vitro* Scientific evaluation on antimicrobial, antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical constituents of traditional coastal medicinal plants, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **83**, 648-657 (2016).
56. A.B.S.d. Lima, I.M.B.N. Queiroga, G.M.d.S. Silva, J.S. da Costa, J.P.d.S. Guedes, C.d.O. Dantas, M.T. Cavalcanti, Characterization and application of *Lippia alba* (Mill) and *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oils as natural sanitizers in coriander, *Food Science and Technology*, Campinas, **39**(4), 993-998 (2019).
57. M.D.S. Ribeir, G.O. Everton, P.V. Serra-Rosa, E.R.N. Pimenta, A.P.d. Araújo-Neto, A.A.S. Dias, A.P. Matos-Pereira, D.P. do Nascimento, A.M.A.S. Carvalho, L.d.S. Silveira, I.T.P. de Sousa, V.E. Mouchrek-Filho, Total phenolics, toxicity and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm, *Research Society and Development*, **9**(7), e953975253 (2020).
58. C.P. dos Santos, R.P. de Lira-Lemos, A.F. Santos, Avaliação da toxicidade das espécies medicinais *Alpinia zerumbet* (Pers.) e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. frente *Artemia salina* Leach, *Revista Ambientale*, **2**(2), 65-76 (2010).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

P.V. Serra-Rosa, P.S. Santos Júnior, I.T. Pereira de Sousa, I. Santos da Silva, W.K. dos Santos-Farias, L. dos Santos-Souza, L. dos Santos-Souza, D. Fonseca, A. Pereira de Araújo-Neto, G. Oliveira-Everton, Chemical constituents, larvicidal activity and molluscicidal from fresh leaves of *Alpinia zerumbet* (Pers.) and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(2), 571-589 (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 rcci-quifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al Comité Editorial. Después de que los evaluadores o el Comité Editorial lleven a cabo

una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de este ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para su publicación en otros medios.

Criterios para la presentación de manuscritos

- La fuente de los manuscritos debe ser Times New Roman tamaño 12.
- No se admiten notas a pie de página.
- Título, centrado y en minúscula.
- Autor(es) con su respectiva filiación institucional y correo electrónico del autor principal.
- Resumen, *Summary* o Resumen. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palabras chave (debajo de Resumen). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index

Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

- En los manuscritos en español y portugués se empleará la coma (,) como separador decimal, en inglés se utilizará el punto (.).
- Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: Introducción, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones (si las hay), Agradecimientos, Conflicto de intereses y Referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.
- Las tablas deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas.
- Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan 'figuras' y deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de las figuras.

De otro lado, los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos o fracciones evaluados *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la

clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición oficial o unidades SI. Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV λ max (solvente ϵ) nm ($\log \epsilon$). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 ($\log \epsilon$ 2,94).

IR ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: IR ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

EM m/z (% intensidad relativa). Ej.: em m/z (%): 340 (M^+ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3,84 (1H, *d*, J = 10,3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16,60 (t, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción

Referencias de los manuscritos

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, así:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la revista debe ir en letra *itálica*, **volumen en negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de: En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

Tesis: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, *título en cursiva*, Tesis de..., institución, ciudad, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, *Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas*, Tesis de Grado, Universidad del Valle, Cali, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista *rcciquifa_fcbog@unal.edu.co*

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias
Químico-Farmacéuticas
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.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(2)*
se terminó de editar, imprimir y encuadernar
en Proceditor, sobre papel bond de 90 gramos
Bogotá, D. C., Colombia.

