

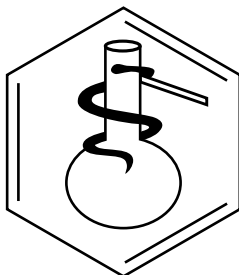
Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



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: rcquiifa_scbog@unal.edu.co

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

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

<https://scholar.google.com/citations?user=TuBT68sAAAJ&hl=es>

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

Vicerector sede Bogotá: José Ismael Peña Reyes, Ph. D.

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 Sasaki, 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.

Alvaro F. Jiménez-Káirus, 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. Chappetta, 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:

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

Berkant Kayan, Ph. D., Department of Chemistry, Arts and Sciences Faculty, Aksaray University, Aksaray, Turkey.

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

Cecilia B. Dobrecky, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Cristian Buendía, Ph. D., Departamento de Química, Universidad Antonio Nariño, Bogotá D. C., Colombia.

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

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

Denize Monaris, Ph. D., Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil.

Diana M. Aragón, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

Diana M. Galindres, Ph. D., Facultad de Ciencias y Humanidades, Fundación Universidad de América, Sede EcoCampus de los Cerros, Bogotá D. C., Colombia.

Eduardo Lagomarsino, Ph. D., Cátedra de Farmacia Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

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

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

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

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

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

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

Yesid S. Murillo, Ph. D., Facultad de Ciencias y Humanidades, Fundación Universidad de América, Sede EcoCampus de los Cerros, Bogotá D. C., Colombia.

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

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

Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: proceditor@yahoo.es

MISIÓN

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

VISIÓN

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

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

ÉTICA

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

LICENCIA CREATIVE COMMONS



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

Contenido

- Spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés produces a potent hypoglycemic effect and improves total serum cholesterol and triglycerides in diabetic rats.
Jesús Rafael Rodríguez Amado, Ariadna Lafourcade Prada, Bianca Rodrigues Acacio,
Veronica Bautista Robles, Hady Keita, Tatiane Pereira de Souza 5
- Método LAMP como alternativa diagnóstica para la detección del virus SARS-CoV-2
María Elizabeth Méndez Tibambre, Zully Johana Rodríguez Parra,
Diana Daniela Portela Dussan, María Fernanda Bustamante Restrepo,
Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez 37
- Estudo prospectivo tecnológico e científico de antissépticos para prevenir a disseminação de SARS-COV-2 e outros vírus patogênicos
Robson Almeida Silva, Fabiany Cruz Gonzaga, Gisele Moraes de Jesus 54
- Hypoglycemic and Antihyperlipidemic effects of *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels and *Syzygium paniculatum* Gaertn.
Renata Junqueira Pereira, Maria das Graças Cardoso, Milene Aparecida Andrade,
Rodrigo Junqueira Pereira 68
- Fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja)
César Joe Valenzuela Huamán, Lida Velazque Rojas, Carolay Julissa Cordova Villavicencio,
Tania de la Flor Cutimpo Paucar 81
- Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) act against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*
Láisa Vilar Cordeiro, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Giulian César da Silva Sá,
Aleson Pereira Sousa, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo, Maria das Neves Silva Neta,
José Maria Barbosa Filho, Edeltrudes de Oliveira Lima 89
- In silico* and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates
Romulo Pereira de Moura Sousa, Daniele de Figuerêdo Silva,
Neuza Maria Cavalcante Oliveira, Zélia Braz Vieira Da Silva Pontes, Hermes Diniz Neto,
Láisa Vilar Cordeiro, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo, Rafael Farias de Oliveira,
Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Petrônio Filgueiras de Athayde Filho,
Edeltrudes de Oliveira Lima 99
- Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant Enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil
Niuane Thais Alves Coelho, Raquel Salviano da Silva, Giovana Morais Delmondes,
William Gustavo Lima, Carlos Eduardo de Matos Jensen, Magna Cristina de Paiva 112

Metabolitos bioactivos y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial extraído de dos especies del género <i>Tagetes</i> Rosa Huaraca Aparco, María del Carmen Delgado Laime, Fidelia Tapia Tadeo	130
Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas John Alexander Torres Lemus, Ángela Patricia Rojas Rojas, Fabián Lopez-Vallejo	144
A descrição teórica da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina, assistida pelo composto do oxihidróxido de cobalto (III) com um corante esquarainico Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. De Oliveira, Lucinda Vaz dos Reis, Petro I. Yagodynets', Zholt O. Kormosh, Olga V. Luganska, Vira V. Kopiika, Natalia V. Novosad, Adriano O. da Silva	168
Associação entre o consumo de café e de medicamentos psicoativos e a qualidade do sono de estudantes universitários Karina Petean Grassi, Rafacla Sirtoli, Renne Rodrigues, Daniela Frizon Alfieri, Camilo Molino Guidoni, Giovana Frazon de Andrade, Edmarlon Giroto	180
Sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros: Revisión narrativa María C. García-Cabrera, Olga T. Guerron-Morales, Juan M. Astaiza-Martínez, Carmenza J. Benavides-Melo	195
Extended Hildebrand solubility approach and Yalkowsky-Roseman model for estimating the solubility of sulfadiazine and sulfamethazine in some {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures Martha Sofia Vargas-Santana, Ana María Cruz-González, Nestor Enrique Cerquera, Alana Sofia Escobar Rodriguez, Rossember E. Cardenas, Omar Calderón-Losada, Claudia Patricia Ortiz, Daniel Ricardo Delgado	216
Histomorphometric analysis in HPV-induced cervical lesions Emanuelly Bernardes-Oliveira, Kleyton Thiago Costa de Carvalho, Ricardo Ney Oliveira Cobucci, Ana Katherine Gonçalves, Deyse de Souza Dantas, Janáina Cristiana de Oliveira Crispim	241
O potencial antimicrobiano do carveol: uma revisão integrativa Gustavo Fernandes Queiroga Moraes, Girlene Macena Santos, Franciele Maiara de Araújo Castro, Igara Oliveira Lima	255

Spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés produces a potent hypoglycemic effect and improves total serum cholesterol and triglycerides in diabetic rats

Jesús Rafael Rodríguez Amado^{1a}, Ariadna Lafourcade Prada^{2b}, Bianca Rodrigues Acacio^{1c}, Verónica Bautista Robles^{1d}, Hady Keita¹, Tatiane Pereira de Souza^{2c}

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.

²Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

E-mail addresses:

^a jesus.rafael@ufms.br

^b ariadnalafu1977@gmail.com

^c bianca.r.acacio@gmail.com

^d robles_verosav@hotmail.com

^e tpsouza@ufam.edu.br

Received: February 2, 2021

Corrected: March 15, 2021

Accepted: March 19, 2021

SUMMARY

Introduction: The species *Calophyllum brasiliense* Cambés (Calophyllaceae) is widespread throughout Central and South America. The stem bark infusion is used for lowering blood glucose. **Aim:** To optimize the spray dry extract of this plant using a D-optimal experimental design. **Materials and methods:** As factors were used the air-drying speed (3.5-4.5 m³/h), the feed flow rate of the suspension (5-11 mL/min), and the inlet air temperature (90-130 °C). The dried extract was characterized by measuring the phenolics and flavonoids content, moisture, the water activity, apparent densities, flowability, and compressibility. The antioxidant activity, the inhibitory activity of lipase and alpha-glycosidase, and the antiglycant activity of the spray dried extract (SDE) were evaluated. Subsequently, the hypoglycemic activity was evaluated in rats by monitoring the blood glucose level, triglycerides, and cholesterol. **Results:** Inlet air temperature and feed flow rate were the factors that most affected the yield and phenolic content. SDE showed a potent antioxidant effect

(IC₅₀ 1.83 µg/mL), a potent α -glycosidase (IC₅₀ 74.45 µg/mL) and pancreatic lipase (IC₅₀ 27.33 µg/mL) inhibition. A potent antiglycation effect (IC₅₀ 9.45 µg/mL) was also observed. **Conclusion:** the SDE showed a potent hypoglycemic effect at 100 mg/kg. These results suggest that SDE could activate four important pathways that can contribute to diabetes control.

Keywords: Jacareúba, diabetes, drying process, optimization, d-optimal design, *Calophyllum brasiliense*.

RESUMEN

El extracto secado por pulverización de *Calophyllum brasiliense* cambés produce un potente efecto hipoglucémico y mejora el colesterol sérico total y los triglicéridos en ratas diabéticas

Introducción: la especie *Calophyllum brasiliense* (Calophyllaceae) está muy extendida en Centro y Suramérica. La infusión del tronco reduce los niveles de glucosa en sangre. **Objetivo:** optimizar el extracto seco por aspersión (SDE) de esta planta utilizando un diseño experimental *D-óptimal*. **Materiales y métodos:** como factores se utilizaron la velocidad del gas secante (aire, 3,5-4,5 m³/h), la temperatura de entrada del aire fue 90-130 °C y la velocidad de alimentación, 5-11 mL/min. Se determinó el contenido de fenoles y flavonoides en el extracto seco, la humedad residual, la actividad del agua, las densidades aparentes, fluidez y compresibilidad. Se evaluó la actividad antioxidante e inhibidora de lipasa y alfa-glicosidasa y la actividad antiglicante. También se evaluó la actividad hipoglicemiante midiendo glucosa en sangre, triglicéridos y colesterol. **Resultados:** la temperatura del aire de entrada y la velocidad de alimentación afectaron, significativamente, el rendimiento y contenido de fenoles. El SDE mostró un potente efecto antioxidante (IC₅₀ 1,83 µg/mL), una potente inhibición de α -glicosidasa (IC₅₀ 74,45 µg/mL) y de lipasa pancreática (IC₅₀ 27,33 µg/mL). Se observó un fuerte efecto antiglicante (IC₅₀ 9,45 µg/mL). **Conclusiones:** el SDE mostró un potente efecto hipoglicemiante a 100 mg/kg. Estos resultados sugieren que el SDE podría actuar activando cuatro vías importantes para el control de la diabetes.

Palabras clave: Jacareúba, diabetes, secado, optimización, diseño d-óptimo, *Calophyllum brasiliense*.

RESUMO

O extrato seco por aspersão de *Calophyllum brasiliense* Cambés produz um potente efeito hipoglicemiante e melhora o colesterol total e triglicérides em ratos diabéticos.

Introdução: a espécie *Calophyllum brasiliense* (Calophyllaceae) é amplamente distribuída na América do Sul e Central. A infusão da casca do caule reduz os níveis de glicose no sangue. **Objetivo:** otimizar o extrato seco por pulverização (SDE) desta planta usando um planejamento experimental D-ótimo. **Materiais e métodos:** a velocidade do gás de secagem ar (3,5-4,5 m³/h), a temperatura de entrada do ar (90-130 °C) e a taxa de alimentação (5-11 mL/min) foram usados como fatores. Foi determinado o teor de fenóis e flavonóides no extrato seco, a umidade residual, a atividade de água, as densidades aparentes, a fluidez e a compressibilidade. Avaliou-se a atividade antioxidante e a atividade inibitória de lipase e alfa-glicosidase, e a atividade antiglicante do extrato seco. A atividade hipoglicêmica foi avaliada em ratos diabéticos, medindo a glicose no sangue, triglicérides e colesterol. **Resultados:** a temperatura de entrada do ar e a taxa de alimentação afetaram significativamente o desempenho e o conteúdo de fenóis. O SDE mostrou um potente efeito antioxidante (IC₅₀ 1,83 µg/mL), uma significativa inibição de α -glicosidase (IC₅₀ 74,45 µg/mL) e da lipase pancreática (IC₅₀ 27,33 µg/mL). Um forte efeito antiglicante também foi observado (IC₅₀ 9,45 µg/mL). O SDE mostrou um forte efeito hipoglicemiante à concentração de 100 mg/kg. **Conclusões:** Esses resultados sugerem que o SDE poderia atuar ativando quatro vias importantes para o controle do diabetes.

Palavras-chave: Jacareúba, diabetes, secagem, otimização, planejamento D-ótimo, *Calophyllum brasiliense*.

INTRODUCTION

The species *Calophyllum brasiliense* Cambés (Calophyllaceae) is widespread throughout Brazil, growing in all kinds of environments from humid climates such as the Amazonia and drier one like Brazilian *Cerrado* [1]. This species is popularly known as *jacareúba* [2]. The tree reaches about 40 m in height, 3 m in diameter with a thick stem bark (\approx 2 cm). The infusion of the stem bark of *Calophyllum brasiliense* Cambés (CBC) is used for treating infected wounds, stomach pains, liver disorder, inflammation, diabetes, diarrhea, and hemorrhoids [3]. Despite the great pharmacological potential of

this medicinal plant, few efforts have been made for transforming the stem bark of CBC and its extracts in standardized products that can be used, safely, in therapeutic.

The ethanolic extract of the stem bark (CBE) content phenolics and flavonoids compounds as gallic acid, quercetin, and hyperin [1]. Also content xanthonones and coumarins [4, 5]. The anti-inflammatory and hypoglycemic effect of CBE has been associated with phenolics and flavonoids [6]. The high electronic density of phenolics and flavonoids induces strong scavenging of reactive oxygen species (abundant in decompensated diabetics), contributing to the patient homeostasis [7]. On the other side, phenolics and flavonoids are strong inhibitors of enzymes associated to protein and carbohydrate metabolism [8], contributing indirectly to lowering the blood glucose of diabetics [3, 9, 10].

The stability of phenolics and flavonoids compounds in solution is affected by factors such as light, temperature, oxygen, and pH [11]. CBE and its hydroalcoholic solutions when unprotected from light under ambient conditions develop a superficial and firm film that is thicker as the concentration of solids increase. This probably occurs by the oxidative effect of light and/or oxygen on xanthonones and phenolics. For this reason, the preparation of a dried powder could be an excellent way to preserve and stabilize the actives present in the extract. Dried extracts present advantages as compared with liquid extracts such as a higher concentration, facility of storage, and transportation, and others [12].

Among the techniques for drying vegetal extracts, spray drying appears as the most promissory, allowing to prepare solid products from fruits, vegetables, and medicinal plant at a relatively low cost with additional benefices to final products, like a better stability, improved flowability and compressibility [12]. Vegetal extracts to be dried by spray drying are added with drying adjuvants, which allow obtaining powders with low moisture content, avoiding active degradation, and suitable physic mechanical properties, which is particularly important for pharmaceuticals formulations.

Metabolites present in plant extracts can activate several physiologic responses at the same time. For this reason, the use of plant extracts in diabetics arises as an excellent possibility of treatment. Thus, this work aimed the optimization of drying parameters for obtaining the spray-dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés (SDE), and the evaluation, *in vitro*, various antidiabetic mechanisms (antioxidant, antiglycant, glucosidase inhibition). The hypoglycemic effect of the SDE was also evaluated in Wistar rats, in an alloxan-induced diabetic model.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material

The stem bark of *Calophyllum brasiliense* was collected from a population of adult trees located at 0°87'16.8"N, -51°14'62.6"W, Municipality of Ferreira Gomes, Amapá, Brazil. The species were identified, and the voucher (code 0598AP) was deposited in the Herbarium of the Institute of Studies and Research of the Amapá State (Iepa), Brazil. The drug was dried in the shadow to a constant moisture content (<14%) and milled using a knife mill, for obtaining a particle size \approx 5 mm.

Extract preparation

CBE was prepared by dynamic maceration. The drug (500 g) was placed in an amber bottle containing 2L of 70% hydroalcoholic solution for 72 h. The mixture was mechanically stirred for one hour, twice a day, for three days. The extractive solution was filtered using a cotton cloth and concentrated in a rotary evaporator (Ika® Werke GMBH & Co., Germany) at 40 °C, up to a final drug: solvent ratio of 2:1 (g/mL). The extract was placed into an amber bottle and stored at room temperature, protected from light.

Extract characterization

Immediately after the preparation, the appearance, aroma, and flavor of the CBE were evaluated. Total solids, density, and the refraction index were also evaluated [13]. The pH was directly measured using a pH-meter (Tecnopon®, Brazil), previously calibrated with buffer solutions (pH 4, and 7, Alphatec®, Brazil). For the development of the experimental design, the total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, using gallic acid (Sigma®, USA) as the standard [14]. The content of gallic acid in the SDE was determined by HPLC (Sigma®, USA). Flavonoids content was determined spectrophotometrically by the aluminum chloride method, using a quercetin primary standard (Sigma®, USA) [14]. All measurements were performed in triplicate and expressed as the mean with the standard deviation.

Adjuvants selection

Three experiments were made for selecting the drying aids to be used for preparing the spray-dried extract of *Calophyllum brasiliense* (SDE). The CBE (100 mL) was added with 0.25 percent (w/v) of colloidal silicon dioxide plus 5 g of microcrystalline cellulose (Avicel® PH 102), or lactose monohydrate (Sigma®, USA), or maltodextrin (Sigma®, USA). The following drying conditions were used: air drying speed 4.0 m³/h, feed flow rate 8 mL/min, an inlet air temperature of 110 °C. The adjuvants that allow

obtaining the dried product with the highest phenolics content, the highest yield, and the lowest moisture content will be selected.

Drying process

For preparing the SDE, a Mini-Spray Dryer (MSD) 1.0 (Labmaq®, Brazil) was used. A D-optimal experimental design was applied for optimizing the drying conditions (table 1). The operational parameters used as factors were air drying speed (ADS, 3.5-4.5 m³/h), the feed flow rate of the suspension (FR, 5-11 mL/min), and the inlet air temperature of the drying air (IAT, 90-130 °C). The airflow for spraying the suspension into the drying chamber (30 L/min), and the nozzle diameter (1.0 mm) were kept constant.

The suspension was stirred during the drying process using a magnetic stirrer (Fisaton®, Brazil). Phenolics content (%), process yield (%), the water activity, outlet temperature (°C), and the moisture content (%) were used as responses. The response outcomes were fitted to mathematical models (equation 1) using the Design Expert Software 12.0 (StatEase®, USA). The effect of factors for constructing the theoretical models was estimated using the Backward elimination technique. In this technique, all factor is entered into the first model equation, and each one is eliminated (one at a time) if they do not contribute (p-value >0.05) to the model fitting [15].

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (1)$$

Where Y are the responses and β are the coefficients representing the magnitude of the factors' effect. β_0 , intercept; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ are the linear effect of factors X_1, X_2, X_3 ; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ are the effect of interaction of the factors $X_1 X_2, X_1 X_3, X_2 X_3$; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$, the effect of the quadratic factors X_1, X_2, X_3 ; and β_{123} are the effect of the interaction of the factors $X_1 X_2 X_3$.

The optimization of the drying process was performed using the Desirability function, a multiple response approach [15]. This function allows assigning levels of importance to responses for signaling the desirable value, to achieve the optimized response (equation 2):

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \dots d_n)^{\frac{1}{n}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

However, the predictive power of the Desirability function (D) depends on the predictive power of the adjusted model of the individual responses. Thus, the high the good-

ness of fit (R²) and goodness prediction (Q²) of the adjusted model the higher the predictor capability of the Desirability function. Desirability represents the geometric mean of all transformed responses, being d_i the desirable ranges of the response i ; and n , the number of responses used for optimization.

Table 1. Outcomes of the D-optimal experimental design for the drying optimization showing the factors in actual and coded values.

Run	Inlet air temperature (°C)	Feed flow rate (mL/min)	Air drying speed (m ³ /min)
1	130 (+1)	5 (-1)	3.5 (-1)
2	130 (+1)	11 (+1)	3.5 (-1)
3	90 (-1)	11 (+1)	4.5 (+1)
4	130 (+1)	5 (-1)	0.5 (+1)
5	90 (-1)	5 (-1)	0.5 (+1)
6	130 (+1)	11 (+1)	0.5 (+1)
7	110 (0)	8 (0)	4 (0)
8	90 (-1)	11 (+1)	3.5 (-1)
9	110 (0)	8 (0)	4 (0)
10	90 (-1)	5 (-1)	3.5 (-1)
11	110 (0)	11 (+1)	3.5 (-1)
12	110 (0)	5 (-1)	3.5 (-1)
13	130 (+1)	8 (0)	4 (0)
14	110 (0)	11 (+1)	4 (0)
15	110 (0)	8 (0)	5 (+1)
16	90 (-1)	8 (0)	4 (0)
17	110 (0)	5 (-1)	4 (0)
18	110 (0)	8 (0)	3.5 (-1)
19	90 (-1)	5 (-1)	4.5 (+1)
20	110 (0)	8 (0)	4 (0)
21	130 (+1)	5 (-1)	0.5 (+1)
22	90 (-1)	5 (-1)	3.5 (-1)
23	110 (0)	8 (0)	4 (0)

Coded values in parenthesis: high-level (+), center (0), low-level (-1).

Water activity

The water activity of the SDE was determined using a water activity meter (Aqua Lab 4Tev[®], USA). The assay was made in triplicate, and the result was expressed as the mean \pm standard deviation.

Moisture content

Moisture content of SDE was performed immediately after the dried process using an Infrared Moisture Analyzer (Shimadzu[®], Japan). The assay was made in triplicate.

Dry extract flowability and compressibility

Carr's index (CI) was determined as Lachman and co-workers [16]. For determine the Carr's index, the bulk (D_B) and taped (D_T) density were determined using a powder flow analyzer (Micro-System[®], UK). CI was calculated as equation 3:

$$CI(\%) = \left(\frac{D_T - D_B}{D_T} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Flow rate (F_R) was measured by pouring a mass (m) of SDE in a glass funnel (wall of 45°) with an exit orifice of 8.0 mm and measuring the time (t) taken for the mass powder to flow through the orifice. The flow rate was calculated using equation 4:

$$F_R = \frac{m \text{ (g)}}{t \text{ (s)}} \quad (4)$$

Scanning electronic microscopy

Particle morphology was evaluated by Scanning Electronic Microscopy (SEM) (Hitachi[®] TM3030 Plus, Japan). A sample of the dry extract was spread out over the microscopy sample slide using a carbon adhesive tape and directly positioned on the microscope chamber. Microphotographs were taken using an accelerating voltage of 5.0 kV, and a magnification of 1000, and 5000x.

Particle size analyses

The Sauter Mean Diameter (D3,2) and the particle size distribution were determined by optical microscopy, using an Olympus[®] microscopy (USA). Images of the SDE (thoughtfully dispersed in a glass lamina) were taken using a Canon[®] camera (Japan). Images were analyzed using Image Pro-plus 7.0[®] Software. A total of 1500 particles measured, and the particle size and the size distribution were determined using Stat-Graphics XV.1 (Stat Easy[®], USA).

DPPH radical scavenging

The radical scavenging activity was evaluated by spectrophotometry (Shimadzu®, Japan), using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical [10, 17, 18]. For biological assays, the blank solution was prepared by dissolution of 0.25 g of colloidal silicon dioxide plus 5 g of lactose monohydrate in 100 mL of PBS buffer (pH 7.4). The mixture was sonicated for 10 min, filtered by a Millipore membrane (0.45 µm), and diluted at the same concentrations used for the SDE (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50 and 100 µg/mL).

Alpha-glycosidase inhibition

The assay was made in 96-wells microplates according to Kiho and coworkers [17, 19]. The enzyme solution was prepared by dissolving 3 mg of rat intestinal acetone powder (Sigma®, USA) in 1 mL of buffer phosphate (pH 6.9). The solution was centrifuged at 5000 rpm for 15 min, filtered by a Millipore® membrane (0.45 µm), and the supernatant was used for the assay. The standard and the tested substances were prepared in concentrations of 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, and 100 µg/mL. In the microplate wells were placed 30 µL of DMSO (used as the control), the standard solution of Acarbose®, and the SDE solutions. To each well was added 170 µL of enzyme solution. Microplates were incubated protected from light, for 5 min, at 37 °C. After that, 100 µL of 4-nitrophenyl α-d-glucopyranoside was added to each well and incubated again for 20 min. The analysis of the percent of inhibition (%I) was performed in triplicate and it was determined using equation 5:

$$\%I = \left(\frac{A_{a/p}}{A_C} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

$A_{a/p}$ = Absorbance of the Sample-Absorbance of the blank, A_C = Absorbance of the negative control-Absorbance of the Blank.

The blank solution was prepared as described above for evaluating the antioxidant effect. The IC₅₀ values were estimated by Probit analysis using the GraphPad® Software (USA), at a level of significance of p=0.05.

Pancreatic lipase inhibition

The assay was made in 96-wells microplates according to Kiho and coworkers [17, 19]. The enzyme solution was prepared by dissolving 4 mg of pancreatic lipase (type II, L3126-25G, Sigma®, USA) in 5 mL of Trisma-HCl (pH 7.6). After that, the substrate solution was prepared by dissolving 20 mg of 4-nitrophenyl palmitate (N2752-50G, Sigma®, USA) in 5 mL of acetonitrile: ethanol (1:1) solution. The standard substance,

the blank (prepared as described before), and the SDE were prepared in concentrations of 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The wells were prepared as follows: 30 μL of the DMSO (Control), Orlistat[®] (Standard drug), and the SDE solutions. After that, each well was added with 250 μL of the enzymatic lipase solution, and the microplates were incubated in the dark for 5 min, at 37 °C. After that, 20 μL of substrate solution was added to each well. Microplates were incubated again for 10 min until the absorbance of the Control (at 450 nm) was equal to 1.00 ± 0.10 . The assay was performed in triplicate, and the percent of inhibition (%*I*) was calculated by using the equation 5 again. The IC_{50} was estimated by Probit analysis using the GraphPad[®] Software (USA), at a level of significance of $p=0.05$.

Antiglycation activity

Oxidative pathway

The assay was made according to Kiho and co-workers with modifications [17]. A reaction mixture was prepared to afford 10 mL of a buffer phosphate solution (0.20 M, pH 7.4) containing BSA (10 mg/mL), glyoxal (30 mM), and sodium azide (3 mM) as an antibacterial agent. For the assay, 300 μL of the reaction mixture was incubated with solutions of different concentrations of SDE (10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gallic acid equivalent). Quercetin was used as the standard antiglycant oxidative agent and DMSO as the negative control. As a blank, a phosphate buffer saline solution (100 μL) was used. Microplates containing substances to be evaluated were incubated at 37 °C, for 72 h, in darkness. After that, the fluorescence intensity at 370 nm (excitation) and 447 nm (emission) using a spectrofluorometer RF-1500 (Shimadzu[®], Japan). The assay was made in triplicate. Results were expressed as a percent of inhibition for estimating the IC_{50} , using the statistic package GraphPad Prism[®] 6.0, USA. Percent of inhibition was calculated as equation 6:

$$\%I = 100 - \left(\frac{F_{a/p}}{F_C} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

$F_{a/p}$ is the blank fluorescence less the sample fluorescence, and F_C is the blank fluorescence less the control fluorescence.

Non-oxidative pathway

The assay was made in the same conditions used for the oxidative pathway but using fructose (0.1 mM) instead glyoxal. Aminoguanidine was used as the standard antiglycant drug by a non-oxidative pathway [17].

Hypoglycemic activity

Forty-nine female albino rats (10-12-week-old) were acclimatized for a week, under controlled temperature (22 ± 3 °C), relative humidity ($60 \pm 10\%$), and 12/12 h light-dark cycle. They had free access to chow and distilled water during the experiment. The assay was performed in agreement with the Ethics Committee for Use of Laboratory Animals (Ceua). Federal University of Amapá (Unifap), Macapá-AP, Brazil, protocol number 012/2017. Alloxan (100 mg/kg/every 72 h, for a week) was used by the intraperitoneal route for inducing diabetes. The blood glucose was determined using a standard glucometer. Animals with glucose level above 250 mg/dL were randomly assigned to six experimental groups (7 animals each, group II to VII):

- Group I, healthy group, treated with one mL of distilled water.
- Group II, diabetic group, received one mL of distilled water.
- Group III, diabetic group, received daily, glibenclamide 25 mg/kg.
- Group IV, diabetic group, received daily, 5 mg/kg of SDE.
- Group V, diabetic group, received daily, 25 mg/kg of SDE.
- Group VI, diabetic group, received daily, 50 mg/kg of SDE.
- Group VII, diabetic group, received daily, 100 mg/kg of SDE.

Doses of SDE were calculated as gallic acid equivalent. Treatments were administered (orally) for 25 days, using an intragastric cannula. The blood glucose was determined at days 0, 5, 10, 15, 20, and 25 using a standard glucometer (Roche®, Germany). At the same time, the food and water intake, the body weight, and the total serum cholesterol and triglycerides were determined using standard procedures of commercial kits (Sigma®, USA).

Statistical analysis

The one-way Anova followed by the Tukey's HSD test was made to evaluate statistical differences among the groups. It was considered significant statistical difference at $p < 0.05$. The analysis was made using StatGraphics® Centurion XV.1 software (USA).

RESULTS

Physic-chemical properties of CBE

The physic-chemical properties of the fresh extract of *Calophyllum brasiliense* are presented in table 2.

Table 2. Physicochemical properties of the extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés (n=3).

Property	Value
Appearance	Brownish liquid
Aroma	Woody odor
Flavor	Astringent and bitter
Total solids (%)	2.84 ± 0.25
Density at 25°C (g/mL)	0.987 ± 0.012
pH	5.49 ± 0.02
Refraction index (n_D at 25 °C)	1.543 ± 0.025
Flavonoid (as quercetin (%))	0.65 ± 0.12
Gallic acid (%)	1.27 ± 0.10

Drying process

Table 3 presents characteristics of the dry products obtained using different combinations of drying adjuvants. The process performed with lactose monohydrate combined with colloidal silicon dioxide produced the dried extract with the higher phenolic content and yield, and the lesser moisture. Based on these results, lactose monohydrate (5%), and colloidal silicon dioxide (0.25%), were selected as drying aids for preparing the spray dried extract. The outcomes of the experimental design for the drying optimization process are presented in table 4.

Table 3. Properties of dry products obtained using different drying aids (n=3).

N.º	Drying aids (%)				Yield (%)	Phenolics (%)	Moisture (%)
	CDS	MCC	LM	MD			
1	0.25	5.00	-	-	^a 67.74±2.19	^a 5.35±0.19	^a 8.30±0.42
2	0.25	-	5.00	-	^b 75.53±3.15	^b 6.37±0.33	^b 5.62±0.38
3	0.25	-	-	5.00	^b 76.11±2.35	^c 4.86±0.72	^c 8.87±0.16

CSD: colloidal silicon dioxide; MCC: microcrystalline cellulose; MD: maltodextrin. Different letter in a column indicates statistically significant differences.

Table 4. Outcome’s matrix of the experimental design for optimizing the drying process of the hydroalcoholic extract of *Calophyllum brasiliense* (n=3).

Run	Phenolic Content (%)	Process Yield (%)	Water activity	Moisture Content (%)	Outlet Temperature (°C)
1	5.61 ± 0.23	66.84 ± 2.33	0.47 ± 0.07	5.72 ± 0.42	105.00 ± 1.25
2	5.93 ± 0.19	66.21 ± 3.11	0.47 ± 0.07	4.86 ± 0.12	93.00 ± 1.33
3	5.27 ± 0.22	77.97 ± 0.98	0.58 ± 0.09	5.18 ± 0.24	63.60 ± 1.42
4	5.42 ± 0.28	57.38 ± 1.55	0.43 ± 0.08	5.21 ± 0.29	112.70 ± 1.88
5	5.42 ± 0.20	71.48 ± 2.22	0.44 ± 0.09	4.95 ± 0.22	78.70 ± 1.95
6	4.84 ± 0.17	77.71 ± 3.47	0.51 ± 0.08	6.87 ± 0.31	100.00 ± 1.22
7	5.17 ± 0.19	70.63 ± 2.10	0.57 ± 0.07	5.78 ± 0.27	85.60 ± 1.37
8	6.13 ± 0.31	71.79 ± 2.99	0.49 ± 0.08	6.13 ± 0.41	64.00 ± 1.38
9	5.71 ± 0.23	74.74 ± 2.46	0.43 ± 0.09	6.75 ± 0.40	82.00 ± 1.76
10	4.97 ± 0.17	74.87 ± 2.45	0.57 ± 0.06	5.91 ± 0.09	73.00 ± 1.19
11	7.89 ± 0.21	70.31 ± 0.75	0.40 ± 0.09	5.03 ± 0.19	87.30 ± 1.99
12	6.06 ± 0.19	68.44 ± 1.21	0.68 ± 0.05	5.61 ± 0.23	90.67 ± 1.28
13	6.26 ± 0.23	73.87 ± 4.51	0.38 ± 0.09	5.57 ± 0.26	107.67 ± 1.72
14	6.22 ± 0.22	74.66 ± 1.77	0.62 ± 0.08	5.27 ± 0.29	88.33 ± 1.55
15	6.97 ± 0.19	64.57 ± 2.85	0.53 ± 0.05	7.29 ± 0.38	91.00 ± 1.63
16	5.38 ± 0.22	58.47 ± 0.88	0.53 ± 0.03	6.58 ± 0.33	70.70 ± 2.51
17	6.33 ± 0.10	70.01 ± 1.71	0.41 ± 0.03	6.64 ± 0.22	91.00 ± 1.79
18	7.17 ± 0.18	73.74 ± 2.08	0.57 ± 0.08	6.54 ± 0.28	83.00 ± 1.82
19	5.62 ± 0.11	72.98 ± 3.55	0.43 ± 0.06	5.12 ± 0.15	70.50 ± 1.80
20	5.26 ± 0.22	72.13 ± 2.82	0.44 ± 0.09	5.80 ± 0.19	87.20 ± 1.49
21	5.75 ± 0.29	58.88 ± 1.69	0.44 ± 0.09	5.34 ± 0.25	105.36 ± 1.65
22	5.21 ± 0.20	73.37 ± 2.31	0.56 ± 0.09	5.72 ± 0.27	72.25 ± 2.23
23	6.01 ± 0.16	73.24 ± 3.21	0.44 ± 0.09	6.35 ± 0.30	90.25 ± 1.28

Inlet air temperature and the feed flow rate were the factors that most affected phenolic content (figure 1A). The highest phenolic content was reached at 110 °C (Central level of the inlet air temperature). The increase in the feed flow rate of the suspension improved the phenolic content being higher at 11 mL/min. The air-drying speed practically no affects the phenolics content. The data of this response was transformed into the inverse square root ($1/\sqrt{}$) for fitting a quadratic model that showed a non-significative Lack of fit (table 5), adjusted R2 of 0.8237, and Q2 of 0.7888. figure 1B represents

the combined effect of factors on phenolic content, showing the large curvature of the response surface, due to the quadratic effect of the factors and their interactions (table 5).

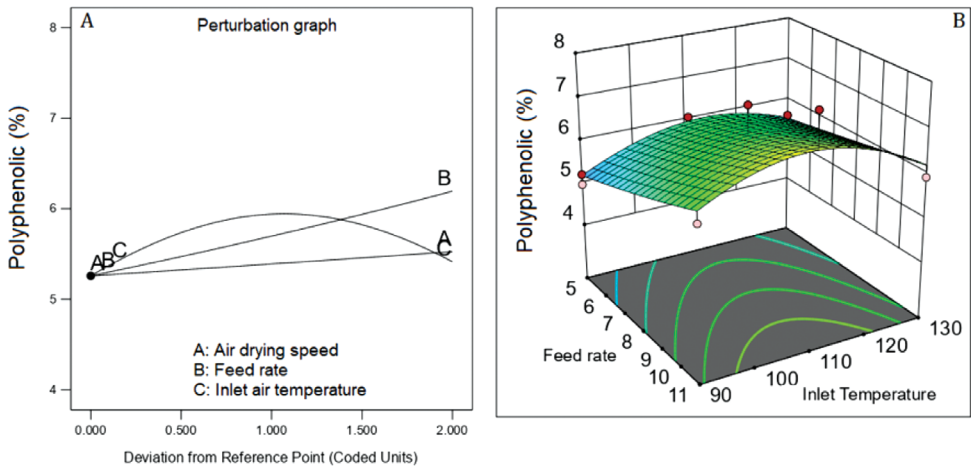


Figure 1. Effect of feed flow rate and inlet air temperature on phenolics content. Air drying speed at $4 \text{ m}^3/\text{h}$.

Table 5 also presents the effect of factors and their interactions on SDE properties. Mathematical transformations were made (when possible) for fitting the response outcome to theoretical mathematical models.

The feed flow rate of the suspension was the factor that most affected the performance of the drying process (figure 2A). The highest yield was achieved at a feed flow rate of $8 \text{ mL}/\text{min}$ (center level), being minor at the lower ($5 \text{ mL}/\text{min}$) and higher ($11 \text{ mL}/\text{min}$) levels. The increase of inlet air temperature (line C, figure 2A) and the air-drying speed (line A, figure 2A) worsened the yield. The outcome of yield was fitted to a reduced cubic model with an adjusted R^2 of 0.8887 and Q^2 of 0.7973. Figure 2B shows the large curvature of the response surface caused by the effect of factors and their interaction (table 5). The interactions feed flow rate: air-drying speed and feed flow rate: inlet air temperature improved the yield. However, the interaction air-drying speed: inlet air temperature diminished the yield (coefficients with negative signs, table 5).

Table 5. Effect of factors and interactions and their contribution to fitting the theoretical models of responses.

Factor	Total phenolics (%)		Process yield (%)		Water activity -		Moisture content (%)		Outlet temperature (°C)	
	Coefficient	P _{value}	Coefficient	P _{value}	Coefficient	P _{value}	Coefficient	P _{value}	Coefficient	P _{value}
Intercept	0.403	0.017	70.57	0.001	0.4672	0.027	0.3985	0.009	86.42	0.0000
ADS	0.003	0.008	-4.580	0.030	-0.0100	0.010	-0.0170	0.010	-	-
FR	0.003	0.005	2.940	0.001	-0.0300	0.034	-0.0030	0.005	-32.21	0.0000
IAT	0.009	0.043	7.700	0.001	-0.0400	0.034	-0.0010	0.043	-8.83	0.0009
ADS ²			-1.570	0.031		0.045			-	-
FR ²			1.610	0.022		0.214	0.0260	0.003	-	-
IAT ²	0.023	0.014	-	-		0.125			-	-
ADS*FR	0.014	0.020	3.280	0.001	-0.0800	0.008	-0.0200	0.030	-	-
ADS*IAT			-0.150	0.009			-0.0150	0.012	-	-
FR*IAT			1.980	0.035					-	-
ADS*FR*IAT			1.480	0.010					-	-
Theoretical models										
Transformation	1/√		None		1/√		1/√		None	
Type of model	Quadratic		Cubic		2FI		Quadratic		Linear	
R ²	0.8237		0.8887		0.8391		0.3662		0.9525	
Q ²	0.7888		0.7973		0.7145		0.1105		0.9416	
LoF (p _{value})	0.0690		0.0553		0.1680		0.8090		0.8563	

2FI: two factors interaction; LoF: lack of fit test; R²: goodness of fit; Q²: goodness of prediction; ns: no significant; Significance at p <0.05.

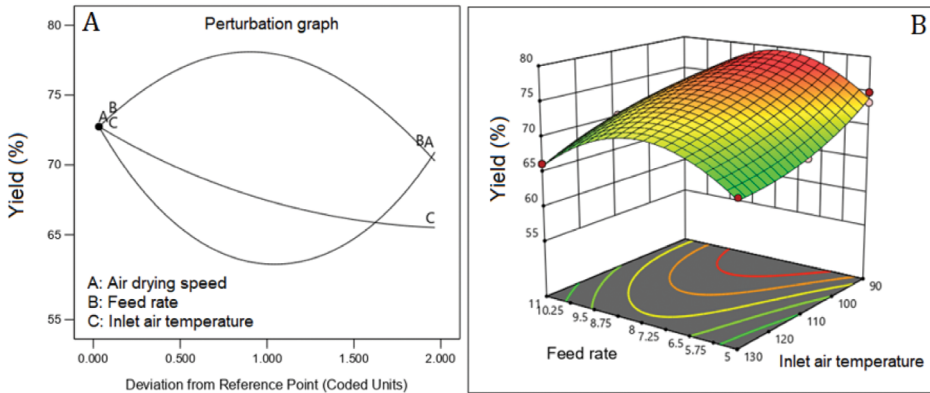


Figure 2. Effect of feed flow rate and inlet air temperature on the yield. Air drying speed at 4 m³/h.

Water activity and moisture content

Water activity and the moisture content showed inverse correlation with the three factors (figure 4A and 5A). The inverse square root of both responses fitted quadratic models. The fitted model for water activity showed good predictability (table 5) with a difference of 1.246 between R² (0.8391) and Q² (0.7145). Contrarily, the model fitted for moisture content showed low values of R² (0.3662) and Q² (0.1105), which means low predictability. The response surface graph of water activity (figure 3B) shows a decreasing curvature produced by the interaction between the air-drying speed and the feed flow rate (coefficient with a negative sign, table 5). Figure 4B presents the sharp curvature of the moisture content produced by the quadratic effect of feed flow rate (a positive sign of the coefficient FR², table 5), which was maximum at 8 mL/min (center level).

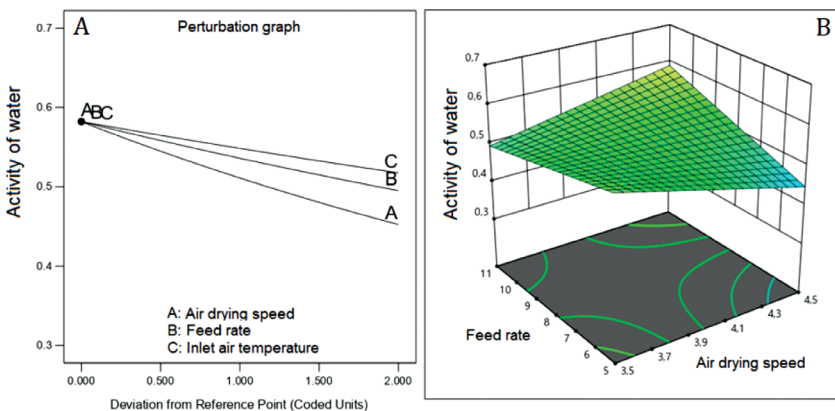


Figure 3. Effect of feed flow rate and air-drying speed on water activity. Inlet air temperature at 110 °C.

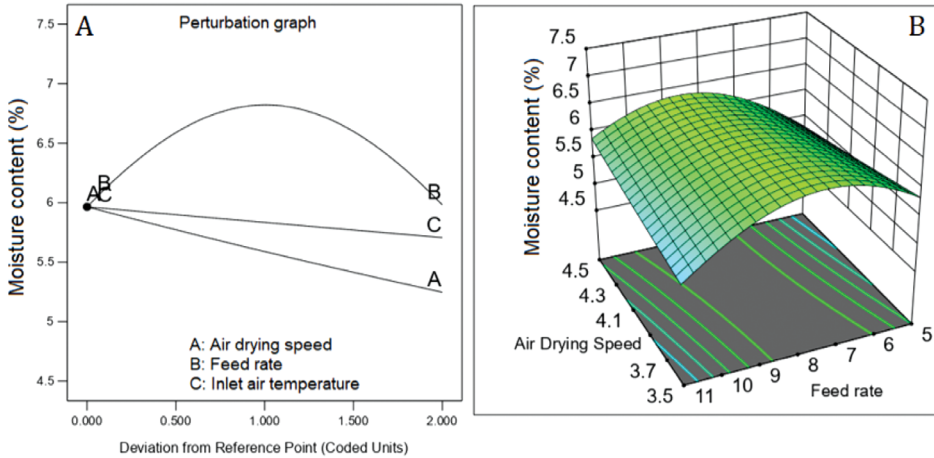


Figure 4. Effect of feed flow rate and the air-drying speed on moisture content. Inlet air temperature at 110 °C.

The outlet air temperature diminished as the feed flow rate increased, showing an inverse correlation (line B, figure 5A). The outlet air temperature raised with the increase of inlet air temperature. By their side, as the air-drying speed increased, the outlet temperature decreased, showing an inverse correlation. This response fits a linear model with an adjusted R2 of 0.9525, Q2 of 0.9416, and a non-significant Lack of fit (table 5). Figure 5B shows a sharp decrease in the response surface of the outlet air temperature caused by the linear effect of the factors, but mainly, by the effect of the feed flow rate.

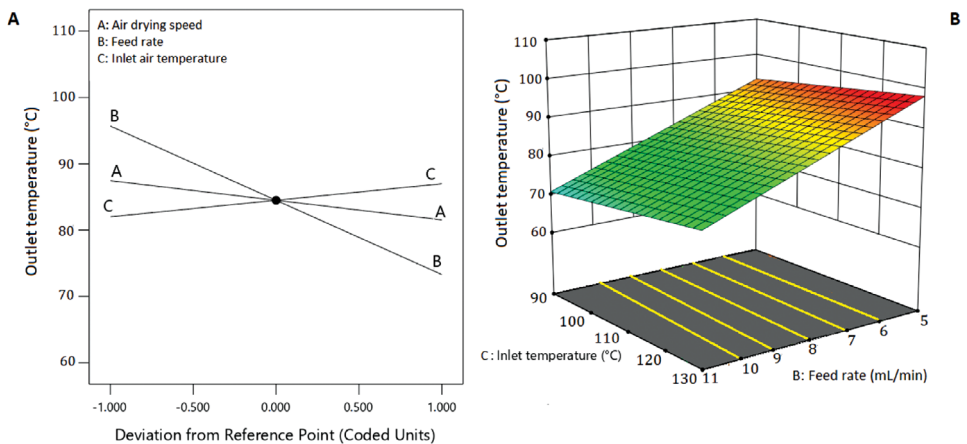


Figure 5. Effect of inlet air temperature and the feed flow rate of the suspension on the outlet temperature. Air drying speed at 4 m³/h.

Multiple response analyses

The optimization of the drying conditions was made by using the Desirability function. The objective was to obtain a dried extract with the high phenolics content, with an excellent product recovery (yield), a low moisture content, and a low activity of water. The prediction showed a Desirability value of 0.731. The predicted value for each parameter is presented in figure 6.

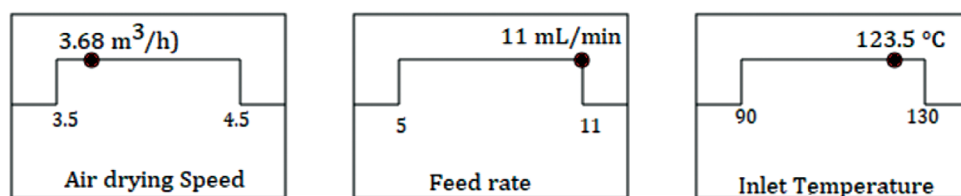


Figure 6. Values of the factors predicted by the desirability function for optimizing the spray drying process.

Three experiments were made using for drying the predicted conditions: Air Drying Speed 3.68 m³/h, Feed flow rate 11 mL/min, and Inlet air temperature 123.5 °C. Table 6 presents a comparison between the predicted and experimental results at $p < 0.05$. In all cases, the t-test suggests that there were no statistically significant differences between the experimental and the predicted values.

Table 6. Statistical comparison of Predicted vs. Observed results for the drying optimization process.

Response	Predicted value	Observed value	t- test, p-value
Yield (%)	74.91 ± 2.60	72.75 ± 1.60	0.0729, 0.9454
Phenolic content (%)	6.48 ± 0.62	6.97 ± 0.05	1.3645, 0.2441
Water activity	0.47 ± 0.06	0.41 ± 0.01	1.6617, 0.1719
Moisture content (%)	5.23 ± 1.85	5.73 ± 0.35	0.3171, 0.2641
Outlet temperature	87.25 ± 3.25	84.46 ± 4.25	1.3658, 0.2214

n=3, significant at $p < 0.05$.

Physic mechanical properties

The optimized SDE exhibited a tap density of 0.470 ± 0.017 g/mL, bulk density 0.367 ± 0.012 g/mL, Carr's index $21.99 \pm 1.06\%$, and a flow rate 2.95 ± 0.17 g. s⁻¹ (using an exit orifice of 8 mm).

Particle morphology and size

The grains morphology of the optimized SDE of *Calophyllum brasiliense* was evaluated by SEM. Microphotographs obtained at 1000 (figure 7A) and 5000x (figure 7B) of magnification can be observed the presence of shape-rounded particles of diverse sizes, with clusters of particles of minor sizes. The SDE showed a normal distribution of particle size (figure 8) with a Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) of 61.23 μm . The data analyses for normality showed standardized skewness of 0.87 and kurtosis of -0.59.

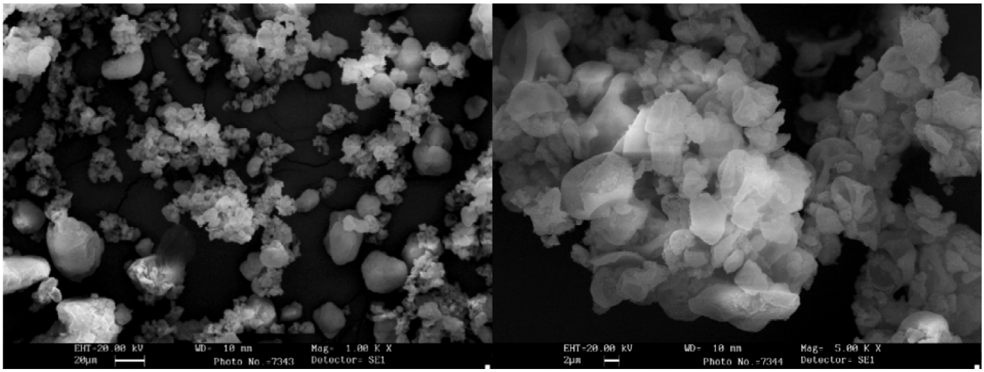


Figure 7. Scanning electronic microphotographs of the optimized spray dry extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés.

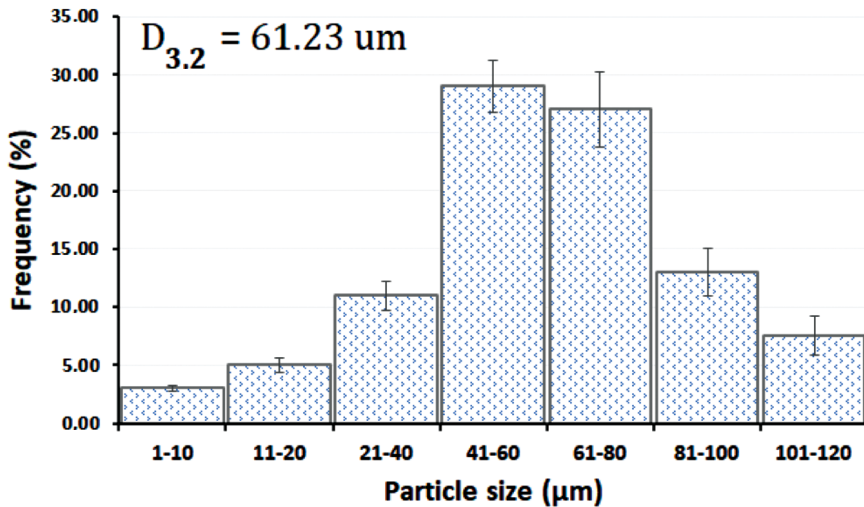


Figure 8. Particle size distribution of the spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés.

Flavonoids and gallic acid content

The spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés content $9.5 \pm 0.52\%$ of gallic acid and $4.85 \pm 0.81\%$ of flavonoids as quercetin.

Antioxidant activity

The antioxidant effect of the SDE and the capacity to inhibit α -glycosidase and pancreatic lipase is presented in table 7. The blank solution showed neither antioxidant activity nor α -glycosidase and pancreatic lipase inhibitory effect. The antioxidant effect of the SDE ($IC_{50} 1.83 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$) was not statistically different from the gallic acid ($IC_{50} 2.87 \pm 0.95$), the standard antioxidant compound ($t=148.56$; $p=0.1478$).

Table 7. Antioxidant effect and enzymatic inhibition capacity of the spray dried extract.

Substance	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	DPPH	α -glycosidase	Lipase
Blank	Φ	Φ	Φ
Dry extract	1.83 ± 0.90^a	74.45 ± 1.45^a	27.33 ± 2.70^a
Gallic acid*	2.87 ± 0.95^a	-	-
Acarbose**	-	65.30 ± 0.60^b	-
Orlistat**	-	-	0.29 ± 0.01^b

Control. Φ : do not inhibit. Different letters in a column denote statistically significant differences.

Lipase and α -glycosidase inhibition

The t-test showed a statistically significant difference ($t=6.24$; $p=0.0234$) between the inhibitory effect of α -glycosidase produced by SDE ($IC_{50} 74.45 \pm 1.45$) and Acarbose® ($IC_{50} 65.30 \pm 0.60$) (table 7). On the other side, SDE exhibited a lipase inhibitor effect ($IC_{50} 27.33 \mu\text{g/mL}$) less potent and statistically different ($t=15.15$; $p=0.0001$) of Orlistat® ($IC_{50} 0.29 \mu\text{g/mL}$).

Antiglycation effect

The potential of SDE to inhibit the end-glycation products (AGEs) formation by both the oxidative and the non-oxidative pathway was evaluated (table 8) using bovine serum albumin (BSA) as model protein. By the oxidative way, SDE showed an IC_{50} of $9.85 \mu\text{g/mL}$, while by the non-oxidative pathway exhibited an IC_{50} of $27.55 \mu\text{g/mL}$. In both cases, the effect of the SDE was stronger than the controls (quercetin by the oxidative pathway and aminoguanidine by the non-oxidative one).

Table 8. Antiglycation effect of the spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés.

Test Substance	Oxidative Pathway		Non-Oxidative Pathway	
	Inhibition (%) (at 100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	Inhibition (%) (at 100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Spray dried extract	99.25 ± 3.25 ^a	9.85 ± 1.25 ^a	98.55 ± 5.78 ^a	20.77 ± 3.27 ^a
Quercetin	86.55 ± 4.18 ^b	36.25 ± 2.92 ^b	-	-
Aminoguanidine	-	-	80.75 ± 6.24 ^b	27.35 ± 4.71 ^b

Different letter in the column indicates statistically significant differences at p <0.05.

Hypoglycemic activity

The blood glucose level of animals of the group I kept between 95-105 mg/dL (figure 9) during the experiment, however, in diabetic animals without treatment (group II) it increased to 335 mg/dL. The blood glucose of the animals treated with glibenclamide 25 mg/kg (group III) was reduced to normal levels in 10 days. All groups treated with the SDE (groups IV to VII) reduced the glucose levels. SDE at 5 mg/kg (groups IV) and 25 mg/kg (group V) was not sufficient to reduce the blood glucose of animals to normal levels. However, doses of 50 mg/kg (group IV) and 100 mg/kg (group V) reduced blood glucose to normal levels in 15 days. No significant statistical difference was observed between the effect of glibenclamide (25 mg/kg) and the SDE at 50 and 100 mg/kg (p <0.05).

Throughout the experiment, the animals of all groups drank water and ingested food normally, except the animal of the group II, which reduced the food consumption and increased the intake of water (table 9). The animals' body weight of all groups, at the day 0, did not present statistically significant differences, however, the day 25, animals of the group II (diabetics without treatment) exhibited bodyweight higher and statistically different than the rest of the groups (p <0.05).

During the experiment, the total serum cholesterol of the group I kept between 91 and 93 mg/dL, differently from group II where increased to 162.35 mg/dL at the end of the experiment. (table 9). In the group III the serum cholesterol increased to 152.83 mg/dL, the day 25. In groups IV and V the serum cholesterol increased slightly above of the superior normal limit of 130 mg/dL [20], however, group VI and group VII showed a strong diminution of total serum cholesterol, reaching (the day 25) values statistically equal to the Group I (normal control).

Serum triglyceride of the group I showed normal values along the experiment (51-54 mg/dL). The group II exhibited elevated values of serum triglycerides along the time reaching 244.15 mg/mL, at the day 25. In the group III it was observed an increase of

the serum triglycerides up to 249.35 mg/dL (table 9), however, the groups IV to VII diminished the serum triglycerides to normal values after at the day 25 (group IV) and at the day 15 the groups V, VI and VII. Notice that, the day 25, the serum triglyceride of the group I and VII were not statistically different ($p > 0.05$).

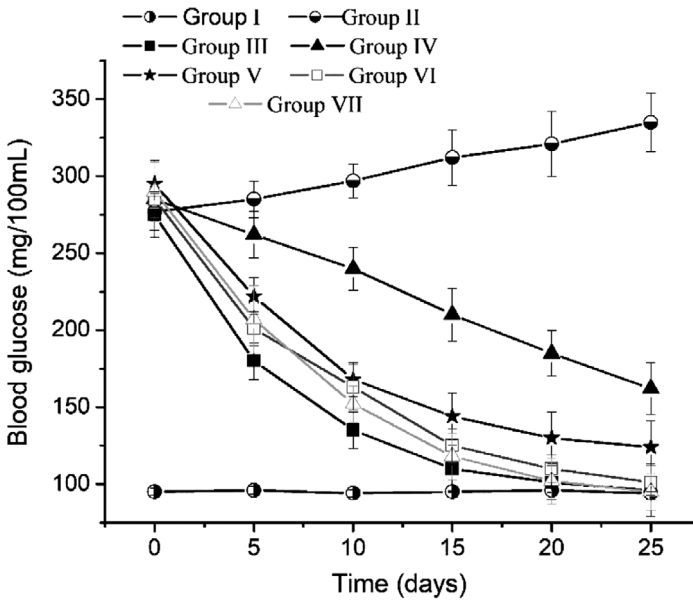


Figure 9. Hypoglycemic effect of the spray dry extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés in Alloxan induced-diabetic rats. Group: I, healthy group, treated with one mL of distilled water; II, diabetic group, received one mL of distilled water; III, diabetic group, received daily, glibenclamide 25 mg/kg; groups IV-VII, diabetic groups treated daily with 5, 25, 50 and 100 mg/kg of SDE, respectively.

DISCUSSION

CBE appears as a brownish liquid, having a strong woody aroma with a bitter and astringent flavor. The content of phenolics ($1.27 \pm 0.10\%$, expressed as gallic acid) and flavonoids ($0.65 \pm 0.12\%$, as quercetin) provided the woody aroma and the astringent taste to the extract. The extraction method used here differs from that proposed by Carvalho and coworkers whose made a hot extraction at 45°C for 96 h, using a drug/solvent ratio of 1:8 (v/v) [6]. Our methodology is simpler than that, exhausting the drug in just 3 days at room temperature, producing an extract with higher solids content (2.87%).

Table 9. Intake of food and water, body weight, and total serum cholesterol and triglycerides of experimental groups during the evaluation of the hypoglycemic effect of the spray dried extract of *Calophyllum brasiliense*.

Parameter	Day	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI	Group VII
Water intake (mL)	25	32.55 ± 4.56 ^a	38.25 ± 3.27 ^b	30.45 ± 2.58 ^a	33.25 ± 4.10 ^a	32.58 ± 3.91 ^a	32.72 ± 5.16 ^a	31.29 ± 4.22 ^a
		23.50 ± 2.35 ^a	15.33 ± 3.37 ^b	24.11 ± 4.63 ^a	23.42 ± 3.33 ^a	24.58 ± 4.60 ^a	23.77 ± 3.19 ^a	25.88 ± 3.01 ^a
Food intake (g)	0	155.05 ± 6.51 ^a	158.55 ± 6.55 ^a	157.21 ± 4.99 ^a	159.28 ± 7.39 ^a	159.81 ± 4.70 ^a	156.99 ± 6.19 ^a	158.77 ± 7.21 ^a
		167.33 ± 7.58 ^a	178.82 ± 5.11 ^a	169.96 ± 6.01 ^a	168.28 ± 5.10 ^a	167.45 ± 6.60 ^a	167.97 ± 5.31 ^a	165.55 ± 4.55 ^a
Body weight (g)	25	175.35 ± 5.11 ^a	192.40 ± 6.88 ^b	177.25 ± 8.22 ^a	175.85 ± 4.69 ^a	176.83 ± 4.09 ^a	174.22 ± 6.70 ^a	172.10 ± 5.58 ^a
		91.33 ± 2.25	138.45 ± 3.36 ^a	138.91 ± 3.82 ^a	142.44 ± 4.55 ^a	142.48 ± 4.02 ^a	141.37 ± 2.74 ^a	144.70 ± 3.77 ^a
Cholesterol (mg/dL)	15	92.57 ± 2.85	148.41 ± 5.66 ^a	145.86 ± 4.02 ^a	139.41 ± 2.32 ^a	136.47 ± 3.33 ^a	133.66 ± 3.28 ^a	102.06 ± 4.20 ^a
		90.21 ± 2.16 ^a	162.35 ± 4.80 ^b	152.83 ± 3.05 ^c	131.53 ± 4.17 ^c	128.55 ± 3.57 ^d	128.41 ± 5.11 ^c	92.00 ± 4.01 ^c
Triglycerides (mg/dL)	0	52.25 ± 1.26 ^a	192.12 ± 3.00 ^a	193.25 ± 2.25 ^a	195.12 ± 3.17 ^a	185.08 ± 4.27 ^a	196.32 ± 3.37 ^a	192.02 ± 3.19 ^a
		53.15 ± 1.26 ^a	214.11 ± 3.17 ^a	209.33 ± 3.55 ^a	164.02 ± 2.87 ^a	130.22 ± 4.27 ^a	116.32 ± 3.01 ^a	74.00 ± 2.08 ^a
	25	51.37 ± 2.09 ^a	244.15 ± 4.99 ^b	249.35 ± 3.57 ^c	111.28 ± 4.18 ^d	99.82 ± 3.93 ^a	65.49 ± 3.39 ^a	52.30 ± 3.01 ^a

Group: I: healthy group, treated with one mL of distilled water; II: diabetic group, received one mL of distilled water; III: diabetic group, received daily, glibenclamide 25 mg/kg; groups IV-VII: diabetic groups treated daily with 1, 10, 100 and 1000 mg/kg of SDE, respectively. Normal values: serum total cholesterol 80-130 mg/dL; serum triglycerides 43-110 mg/dL [20].

Throughout the investigation for obtaining pharmaceutical products based on plant extracts is crucial to establish physic-chemical parameters (properties) for controlling the quality and warrant the product reproducibility. The content of phenolics, flavonoids, total solids, and other properties like density (0.787 g/mL, at 25 °C), refractive index (1.543), and pH (5.49) could be used, preliminarily, for controlling the quality of CBE. Up to our knowledge, there are no technological studies about the preparation and physic-chemical characterization of the extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés.

Botanical extracts submitted to spray drying processes, generally produce sticky materials that adhere to the wall chamber, diminishing the product recovery, hampering the yield, and having unacceptable technological properties [21]. To avoid these problems, solid excipients known as drying aids (adjuncts) are using. An appropriate selection of the drying aids is crucial for obtaining vegetal dried extracts with suitable physic-mechanical properties [22]. In this work, the effect of different combinations of drying aids in the dried extract properties was evaluated, for selecting those providing the high recovery of the dried material (yield), the high content of phenolics, and the minor moisture content (table 3).

The higher phenolic content, and higher yield as well as the minor moisture content, was obtained using lactose monohydrate (5.0%) and colloidal silicon dioxide (0.25%). The drying with maltodextrin or microcrystalline cellulose, instead lactose, had minor yield and produced extracts with higher moisture content. This result contradicts diverse works where the use of microcrystalline cellulose as drying aids for vegetal extracts produced excellent materials. However, there is not a rule, and the drying adjuncts need to be evaluated on a case-by-case basis.

A drying method is as good as its capability to preserve the drug. The critical response in the CBE drying process is the phenolic content. The amount of phenolics in the SDE is a measure of preservation of the actives during the drying process. The antioxidant, hepatoprotective, and hypoglycemic effect of CBE are associated with phenolics and flavonoids content. The inlet air temperature was the factor that most affected the phenolics content. This response was negatively correlated with the air inlet temperature. On the contrary, Phenolics content was positively correlated with the feed flow rate and was practically no affected by the air-drying speed. The higher amount of suspension in the drying chamber, due to the higher feed rate, increases the amount of heat interchanged, diminishing the chamber temperature avoiding the phenolics' degradation. This result agrees with Kha and coworkers [23], which observed that temperatures above 110 °C produced a significant loss of phenolics with consequent loss of the antioxidant activity. The fitted model for phenolics (quadratic model) showed excellent agreement (difference of 0.0349) between the goodness of fit (R2)

and goodness of prediction (Q^2). Difference minor than 0.3 between these values suggest good model predictability.

In spray drying processes, the product recovery - yield - depends not only on the drying parameters but on the characteristics of the product to be dry and the use of drying aids, among other factors. Usually, the drying of plant extract produces sticky materials and low processes yield. Drying aids are used for obtaining a high product recovery, free-flowing materials, and for improving the extract solubility, and stability. The feed flow rate of the suspension was the factor that most affected the yield. The yield was inversely correlated with inlet air temperature and the air-drying speed. This result could be explained because of the higher the inlet air temperature, the higher the heat transfer with a high loss of heat to the environment. On the other side, the increase in feed flow rate could result in a higher yield, probably, due to a decrease in the average drying temperature [24]. In both cases, the product recovery increases, improving the yielding. The yield data fitted a reduced cubic model showing high values of R^2 and Q^2 and a difference of 0.0914 between these values, suggesting good model predictability [15].

Water activity and the moisture content are critical properties of pharmaceutical products. Low moisture content and low water activity are necessary for obtaining suitable physic-mechanical properties [25]. Water activity below 0.60 impairs microbial proliferation improving product stability [26]. The water activity and moisture content are associated and depend on the evaporation rate of liquid from the particle, which is governed by the quantity of heat interchanged during the process [16, 25], among other thermodynamical factors. The moisture content of SDE in all runs kept below 7.29%, and the water activity remained below 0.62. These values are suitable for maintaining the microbiological stability of solid pharmaceutical products. As was expected, the higher the inlet air temperature and air-drying speed, the lower the moisture content and water activity due to the increase of the water evaporation rate and the decrease of the resident time of the extract in the drying chamber [21, 27]. In the same way, the combined effect of feed flow rate and air-drying speed reduce the moisture content and water activity (coefficient with a negative sign, table 5).

The outlet temperature depends on factors like the inlet air temperature, and the heat transferred from the drying gas to the solid material during the evaporation process [27]. In this work, the outlet air temperature was inversely correlated to feed flow rate and the air-drying speed (figure 5A, table 5). This result agrees with Quek *et al.* [28], which reported that the increase of feed flow rate diminished the outlet air temperature and raised the amount of material adhered to the wall chamber. The outlet air temperature fitted a linear model with high values of R^2 and Q^2 (0.9525 and 0.9416,

respectively). Figure 5B exhibits the linear response surface of these responses due to the positive effect of the factors (table 5). The higher the outlet temperature, the minor the moisture content, and water activity [27]. However, with the increase in outlet air temperature, a diminution of the phenolic content was observed. This result agrees with the work of Cortés and coworkers during the production of the spray-dried extract of *B. pilosa* [2], which informed the same behavior for outlet temperature.

The process optimization ensures the reproducibility of drying processes and the obtainment of dried materials of high quality. The responses used for optimization were phenolics content, yield, outlet temperature, and the water activity, due to the high predictability of the fitted models [15]. The optimization aimed to establish processing parameters (values of factors), for producing an SDE with a high content of phenolics, high yielding, and low moisture and water activity. The desirability function had a value of 0.731. The closer to one the desirability value the higher probability to achieve the desired goals [26]. All the responses showed no statistical differences between the observed and predicted values (table 6). This result allows validating the spray-dryer performance using the operational conditions predicted by the optimization tool.

The physic mechanical properties and particle shape and size of the optimized SDE were evaluated. Particle shape and particle size are properties to be considered in solid pharmaceutical materials. SDE exhibits rounded particles (figure 7A) with a Sauter mean diameter of 61.23 μm . The particle size distribution showed normality with kurtosis and skewness between ± 2 [15]. Particles of minor sizes probably formed due to a low number of drying aids in their formation were observed. The trend to form clusters (figure 7B) could result from a high viscosity and surface tension of the liquid suspension, and probably, by a faster grain consolidation [27]. The rounded particles presents in SDE, with a normal size distribution, and a low moisture content of SDE could explain the good flowability (2.95 g/s; orifice 8 mm) and compressibility (Carr' index 21.99%) of this product [15]. Size distribution, particle shape, and moisture are crucial properties for storing and handling solid materials, especially during the implementation of pharmaceutical operations as mixing and compression [15, 29]. The optimization of the drying process and the use of drying aids allows obtaining an SDE with suitable physic-mechanical properties for use in solid forms, like granules, capsules, and tablets.

The use of botanical extracts is as an excellent way for treating multicausal disease like diabetes. Besides the multiple mechanisms acting together, plant extracts produce few adverse effects and are well-accepted by patients. One of the mains uses of the extract of CBC is for reducing blood glucose of diabetic patients [30, 31]. However, are lacking studies evaluating possible hypoglycemic mechanisms of CBC extracts. In this context, the antioxidant activity of SDE and its capability to inhibit α -glycosidase

were evaluated. In both assays, the Blank solution does not show inhibitory activity, indicating that the effect produced by the SDE is produced by compounds present on it. SDE showed an excellent antioxidant effect, that was not statistically different from the gallic acid ($t=1.56$; $p=0.1478$, at $p < 0.05$). In the same way, SDE inhibited α -glycosidase at IC_{50} of $74.45 \mu\text{g/mL}$. The effect was slightly minor and statistically different than Acarbose[®] ($IC_{50}= 65.30 \mu\text{g/mL}$). Phenols and flavonoids are OH-rich compounds that could be bonding to carbohydrates impairing the normal enzymatic function. On the other side, they are responsible for the strong scavenging of free radicals, producing a potent antioxidant effect [7]. Alpha-glycosidases hydrolyze complex carbohydrates for forming simple carbohydrates [31]. The inhibition of α -glycosidase avoids the sharp increase of the postprandial carbohydrates level in blood, improving the glycemic control [31]. SDE also inhibited pancreatic lipase showing an IC_{50} of $67.49 \mu\text{g/mL}$ but was less potent than Orlistat[®] (IC_{50} $0.29 \mu\text{g/mL}$). In obese diabetics, the use of lipase inhibitors could be an effective way of lowering fat absorption, reducing the risks associated with type II diabetes. Drugs α -glycosidase and pancreatic lipase inhibitors are scarce. Botanical extracts with both effects are still more reduced remarking the potential of this extract as a therapeutic agent.

The SDE showed a potent antiglycation effect with IC_{50} $9.85 \mu\text{g/mL}$ by the oxidative pathway and $20.77 \mu\text{g/mL}$ by the non-oxidative one. By both pathways, the effect was more potent than the control quercetin $36.25 \mu\text{g/mL}$ (oxidative way), and amino-guanidine $27.35 \mu\text{g/mL}$ (non-oxidative way). Blood carbohydrates are augmented in uncompensated diabetics. Advanced glycation end products (AGEs) are produced by the reaction of lipids and/or proteins with reduced sugars. They are the main cause of degenerative diseases associated to diabetes like atherosclerosis, chronic kidney disease, and retinopathy [32]. Although the antiglycation effect of plants extract has not been established, some studies suggest that may act hindering the formation of AGEs by preventing further oxidation of Amadori products [33]. This effect can be potentiated by the strong antioxidant effect produced by the SDE, in which phenols and flavonoids plays a special role. In this sense, must be take on account the strong antiglycation effect of the SDE by the oxidative pathway with IC_{50} $9.85 \mu\text{g/mL}$.

In this work, the hypoglycemic effect of SDE in diabetic rats was evaluated using four doses (5, 25, 50, and 100 mg/kg of body weight). Animals of all groups consumed food and drank water normally, except in the group II, which consumed a smaller amount of food that was statistically different from the rest of the groups. This probably happened by the uncontrolled increase of carbohydrates in blood as the animals get worse because they were not treated. The body weight increased in all groups, however, in the group II was higher and statistically difference from the rest of the groups.

Low doses of the SDE (5, and 25 mg/kg) were not effective for reducing the blood glucose of the diabetic rats (groups IV and V), however, doses of 50 and 100 mg/kg produced a potent blood sugar reduction, that was not statistically different from the effect of Glibenclamide 25 mg/kg (group III), onward the day 15 of the experiment. The potent hypoglycemic effect of the SDE could be occurs via inhibition of α -glycosidase, and due to the strong antioxidant effect of this extract.

The SDE lowered total serum cholesterol and triglyceride levels of diabetic animals, being the effect more potent at 100 mg/kg (group VII). The reduction of carbohydrates blood levels onward the day 15 allow improves cholesterol and triglycerides levels. This result agrees with that reported by Carvalho and co-workers who prepared granules for using a liquid extract of CBC [6]. On the other side, the antioxidant effect of the SDE and the inhibition of pancreatic lipase produced by this extract can actively contribute for reducing serum triglycerides.

The spray dried extract of CBC produced a potent hypoglycemic effect in diabetics animal, however, despite the animals has consumed a normal food, after the day 15 the blood glucose level, total serum cholesterol and triglyceride were normal, allowing that the animals maintaining a normal live eating food and drinking water normally. These results must be associated to the effect of the SDE, which could have controlled the diabetes symptoms by three different mechanisms: via antioxidant, via α -glycosidase and lipase inhibition, and via antiglycation. SDE of *Calophyllum brasiliense* Cambés arise as a promissory standardized product, which could be used properly in diabetic/obese patients.

CONCLUSIONS

There are evidence suggesting the use of plant products as an excellent therapeutic strategy for treating multicausal diseases like diabetes. The diversity of compounds presents in the extracts produces a multi-target effect synergizing the beneficial response of patients. The SDE optimized and characterized in this work exhibited excellent hypoglycemic effect in vivo, probably mediated by the potent antioxidant and antiglycation activity, and the powerful capability for inhibiting α -glycosidase. At the same time, SDE at 100 mg/kg reduces the serum cholesterol and triglycerides, probably mediated by the inhibition of pancreatic lipase. The SDE of *Calophyllum brasiliense* Cambés arise as a promissory hypoglycemic product due to the capacity to activate different mechanisms associated to diabetes control. However, other studies must be done for evaluating the real utility of SDE in diabetics.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare that there are not conflicts of interest.

REFERENCES

1. J. Gómez-Verjan, I. González-Sánchez, E. Estrella-Parra, R. Reyes-Chilpa, Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context, *Scientometrics*, **105**(2), 1019-1030 (2015). Doi: 10.1007/s11192-015-1715-2
2. S. Silva, *Árvores nativas do Brasil*, 1st ed., Editora Europa, vol. 1, 2013.
3. V.C. Filho, C. Meyre-Silva, R. Niero, Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*, *Chem. Biodivers.*, **6**(3), 313-327 (2009). Doi: 10.1002/cbdv.200800082
4. C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V. Cechinel-Filho, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: Structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity 1, *J. Nat. Prod.*, **65**(3), 267-272 (2002). Doi: 10.1021/np010398s
5. C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V. Cechinel-Filho, F. Enjo, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins, *J. Nat. Prod.*, **66**(3), 368-371 (2003). Doi: 10.1021/np0203640
6. H. de Oliveira-Carvalho, L.D. Machado-Góes, N.M. Barbosa-Cunha, A. Maciel-Ferreira, C. Pinho-Fernandes, H.A. Silva-Favacho, J.O. Carrera-Silva Jr., B.L. Sánchez-Ortiz, A. Navarrete, J.C. Tavares-Carvalho, Development and standardization of capsules and tablets containing *Calendula officinalis* L. hydro-ethanolic extract, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **46**(1), 16-27 (2018).
7. M. Zhang, M. Chen, H. Q. Zhang, S. Sun, B. Xia, F. H. Wu, *In vivo* hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*, *Fitoterapia*, **80**(8), 475-477 (2009). Doi: 10.1016/j.fitote.2009.06.009
8. J. Zhang, M.-J. Kang, M.-J. Kim, M.-E. Kim, J.-H. Song, Y.-M. Lee, J.-I. Kim, Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* *in vitro* and *in vivo*, *Nutr. Res. Pract.*, **2**(4), 200-203 (2008). Doi: 10.4162/nrp.2008.2.4.200

9. J.A. Scott, G.L. King, Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1031**(1), 204-213 (2004). Doi: 10.1196/annals.1331.020
10. A. Lafourcade-Prada, H. Keita, T. Pereira de Souza, E. Silva-Lima, L.D. Rosales-Acho, M.d.J. Amazonas da Silva, J.C. Tavares-Carvalho, J.R. Rodriguez-Amado, *Cassia grandis* Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect, *Saudi Pharm. J.*, **27**(2), 191-199 (2019). Doi: 10.1016/j.jsps.2018.10.003
11. A. Ali, C. H. Chong, S. H. Mah, L. C. Abdullah, T. S. Choong, and B. L. Chua, Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried Piper betle extracts, *Molecules*, **23**(2), 484 (2018). Doi: 10.3390/molecules23020484
12. D.F. Cortés-Rojas, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira, Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract, *Chem. Eng. Res. Des.*, **93**, 366-376 (2015). Doi: 10.1016/j.cherd.2014.06.010
13. W. Brown, M.R.C. Marques, The United States Pharmacopeia/National Formulary: Its history, organization, and role in harmonization, in: L. Shargel, I. Kanfer (editors), *Generic drug product development: Solid oral dosage forms*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton (FL), 2013, p. 319.
14. A. Cartwright, *The British Pharmacopoeia, 1864 to 2014: Medicines, international standards and the state*, Routledge, London, 2016.
15. R. Myers, D. Montgomery, C. Anderson-Cook, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, John Wiley & Sons, New York (NY), 2016.
16. H. Lieberman, L. Lachman, J. Schwartz, *Pharmaceutical dosage forms. Tablets*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton (FL), 1980.
17. T. Kiho, S. Usui, K. Hirano, K. Aizawa, T. Inakuma, Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(1), 200-205 (2004). Doi: 10.1271/bbb.68.200
18. J.R. Rodriguez-Amado, A. Lafourcade-Prada, J. Lobato-Duarte, H. Keita, H. Rivero da Silva, A.M. Ferreira, E. Hernandez-Sosa, J.C. Tavares-Carvalho, Development, stability and *in vitro* delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles, *Saudi Pharm. J.*, **25**(8), 1158-1168 (2017). Doi: 10.1016/j.jsps.2017.07.008

19. A. Prada, L. Achod, H. Keita, J. Carvalho, T. Souza, J. Amado, Development, pharmacological and toxicological evaluation of a new tablet formulation based on *Cassia grandis* fruit extract, *Sustain. Chem. Pharm.*, **16**, 100244 (2020). Doi: 10.1016/j.scp.2020.100244
20. J. Ihedioha, O. Noel-Uneke, T. Ihedioha, Reference values for the serum lipid profile of albino rats (*Rattus norvegicus*) of varied ages and sexes, *Comp. Clin. Path.*, **22**(1), 93-99 (2013). Doi: 10.1007/s00580-011-1372-7
21. D. Cortés-Rojas, C. Souza, W. Oliveira, Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L., *J. King Saud Univ. Sci.*, **28**(2), 141-146 (2016). Doi: 10.1016/j.jksues.2014.04.004
22. P. Slanc, B. Doljak, S. Kreft, M. Lunder, D. Janeš, B. Štrukelj, Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition, *Phyther. Res.*, **23**(6), 874-877 (2009). Doi: 10.1002/ptr.2718
23. C. Tuyen, M. Nguyen, P. Roach, Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder, *J. Food Eng.*, **98**(3), 385-392 (2010). Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016
24. Y.Z. Cai, H. Corke, Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments, *J. Food Sci.*, **65**(7), 1248-1252 (2000). Doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x
25. L. Lachman, H. Lieberman, J. Kanig, *The theory and practice of industrial pharmacy*, Lea & Febiger, Philadelphia (PA), 1986
26. L. Rockland, G. Stewart, *Water activity: Influences on food quality: A treatise on the influence of bound and free water on the quality and stability of foods and other natural products*, Academic Press, New York (NY), 2013.
27. O.W. Oliveira, P.R. Petrovick, Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações, *Braz. J. Pharmacogn.*, **20**(4), 641-650 (2010).
28. S.Y. Quek, N. Chok, P. Swedlund, The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, **46**(5), 386-392 (2007). Doi: 10.1016/j.cep.2006.06.020
29. M. Ferri, A. Gianotti, A. Tassoni, Optimisation of assay conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components, *J. Food Compos. Anal.*, **30**(2), 94-101 (2013). Doi: 10.1016/j.jfca.2013.02.004

30. S.A. Ahmed, R.M. Gogal, Jr., J.E. Walsh, A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³H. thymidine incorporation assay, *J. Immunol. Methods*, **170**(2), 211-224 (1994). Doi: 10.1016/0022-1759(94)90396-4
31. X. Li, T. Zheng, S. Sang, L. Lishuang, Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal, *J. Agric. Food Chem.*, **62**(50), 12152-12158 (2014). Doi: 10.1021/jf504132x
32. G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini, G. Aldini, Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation, *Free Radic. Res.*, **47**(Suppl. 1), 3-27 (2013). Doi: 10.3109/10715762.2013.815348
33. J. Ramkissoon, M. Mahomoodally, N. Ahmed, A. Subratty, Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs, *Asian Pacific J. Trop. Med.*, **6**(7), 561-569 (2013). Doi: 10.1016/S1995-7645(13)60097-8

HOW TO CITE THIS ARTICLE

J.R. Rodríguez-Amado, A. Lafourcade-Prada, B. Rodrigues-Acacio, V. Bautista-Robles, H. Keita, T. Pereira de Souza, Spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés produces a potent hypoglycemic effect and improves total serum cholesterol and triglycerides in diabetic rats, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 601-632 (2021).

Método LAMP como alternativa diagnóstica para la detección del virus SARS-CoV-2

María Elizabeth Méndez Tibambre^{1a*}, Zully Johana Rodríguez Parra^{1b}, Diana Daniela Portela Dussan^{1c}, María Fernanda Bustamante Restrepo^{1d}, Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez^{2d}

¹Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Carrera 30 N° 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

Autor de correspondencia:

²Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Carrera 30 N° 45-03, Bogotá D.C., Colombia.

Correos electrónicos:

^amemendezt@unal.edu.co

^bzjrodriguezp@unal.edu.co

^cddportelad@unal.edu.co

^dmafe.0215@hotmail.com

^efaaristizabalg@unal.edu.co

Recibido: 3 de febrero de 2021

Revisado: 15 de marzo de 2021

Aceptado: 20 de marzo de 2021

RESUMEN

Introducción: el coronavirus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19 se ha convertido en un problema de salud pública mundial que requiere la implementación de pruebas de diagnóstico rápidas y sensibles. **Objetivo:** evaluar y comparar el límite de detección del método LAMP con respecto al método estándar y aplicar el método RT-LAMP para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en muestras clínicas de pacientes colombianos. **Métodos:** se realizó un estudio descriptivo y transversal, analizando un total de 25 muestras de hisopado nasofaríngeo incluyendo muestras negativas y positivas para SARS-CoV-2, a través del método RT-LAMP comparado con el método estándar RT-qPCR. **Resultados:** el método LAMP detectó ~18 copias del gen *N*, en 30 min, demostrando un límite de detección similar al obtenido con el método estándar, en un menor tiempo y una concordancia en RT-LAMP del 100% con los resultados. **Conclusiones:** RT-LAMP es un método sensible, específico y rápido que puede ser empleado para el diagnóstico de la enfermedad COVID-19.

Palabras clave: Diagnóstico molecular, RT-LAMP, COVID-19, SARS-CoV-2.

SUMMARY

LAMP method as a diagnostic alternative for the detection of the SARS-CoV-2 virus

Introduction: The SARS-CoV-2 coronavirus, that causes the COVID-19 disease, has become a global public health problem that requires the implementation of rapid and sensitive diagnostic tests. **Aim:** To evaluate and compare the sensitivity of LAMP assay to a standard method and use RT-LAMP for the diagnosis of SARS-CoV-2 in clinical samples from Colombian patients. **Methods:** A descriptive and cross-sectional study was conducted. A total of 25 nasopharyngeal swab samples including negative and positive samples for SARS-CoV-2 were analyzed, through the RT-LAMP method compared to the RT-qPCR assay. **Results:** LAMP method detected ~18 copies of the *N* gene, in 30 min, evidenced a detection limit similar to the standard method, in a shorter time and a concordance in RT-LAMP of 100% with the results. **Conclusions:** RT-LAMP is a sensitive, specific, and rapid method that can be used as a diagnostic aid of COVID-19 disease.

Keywords: Molecular diagnostic, RT-LAMP, COVID-19, SARS-CoV-2.

RESUMO

Método LAMP como alternativa de diagnóstico para a detecção do vírus SARS-CoV-2

Introdução: o coronavírus SARS-CoV-2, causador da doença de COVID-19, tornou-se um problema de saúde pública global que requer a implementação de testes diagnósticos rápidos e sensíveis. **Objetivo:** avaliar e comparar o limite de detecção do método LAMP em relação ao método padrão e aplicar o método RT-LAMP para o diagnóstico de SARS-CoV-2 em amostras clínicas de pacientes colombianos. **Métodos:** foi realizado um estudo descritivo e transversal, analisando um total de 25 amostras de hisopado nasofaríngeo, incluindo amostras negativas e positivas para SARS-CoV-2, pelo método RT-LAMP em comparação ao método RT-qPCR padrão. **Resultados:** o método LAMP detectou ~18 cópias do gene N, em 30 min., demonstrando um limite de detecção semelhante ao obtido com o método padrão, em um tempo menor e uma concordância no RT-LAMP de 100% com os resultados. **Conclusões:** RT-LAMP é um método sensível, específico e rápido que pode ser usado para o diagnóstico da doença de COVID-19.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, RT-LAMP, COVID-19, SARS-CoV-2.

INTRODUCCIÓN

La COVID-19 es una enfermedad infecciosa viral, reportada a partir del brote en Wuhan (China) en diciembre de 2019, es considerada como la pandemia más importante del siglo XXI [1]. Hasta el 17 de diciembre de 2020 se reportaron 39 560 casos de defunción en Colombia [2] y 1 658 645 a nivel mundial [3]. El agente causal fue confirmado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el virus 2019-nCoV, mientras que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) le asignó el nombre de SARS-CoV-2 [3, 4].

Los coronavirus son virus de ácido ribonucleico (ARN), pertenecientes a la familia *Coronaviridae*, que pueden causar enfermedades tanto en animales como en humanos [5]. Generalmente, atacan las vías respiratorias superiores desencadenando sintomatologías desde el resfriado común hasta enfermedades más graves como el síndrome respiratorio de Oriente Medio (Mers) y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) [6]. Los principales afectados son personas con alguna comorbilidad como hipertensión, diabetes, cardiopatías, asma, adultos mayores y personas inmunosuprimidas. Los casos severos, generalmente, manifiestan una neumonía grave, que conduce a un estado crítico y posteriormente la muerte. Se estima que, aproximadamente el 80 % de los infectados con SARS-CoV-2 presentan pocos síntomas (fiebre, fatiga, tos y dificultad para respirar) o son asintomáticos; el 15 % desarrolla un cuadro severo de la enfermedad y el 5 % llega a estadios graves y críticos [4, 7].

En atención al estado de emergencia que supone el brote por SARS-CoV-2, muchos países han implementado medidas de contención y mitigación para retrasar los picos de infección y disminuir la demanda en los sistemas de salud. Así, el diagnóstico temprano es vital para controlar la propagación del virus dentro de la población [8-10]. La OMS y el Centro para el control y la prevención de enfermedades de EE.UU. (CDC) aprobaron la técnica RT-qPCR (por sus siglas en inglés *Quantitative reverse transcription PCR*) como prueba estándar para la detección del virus SARS-CoV-2 [11,12]. Este análisis detecta la presencia de ácidos nucleicos virales con alta sensibilidad y especificidad, en muestras de esputo, hisopados de garganta y secreciones del tracto respiratorio inferior, sin embargo, entre sus limitantes se cuentan la necesidad de equipos complejos, sondas fotosensibles y personal capacitado o especializado en biología molecular. Además, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la obtención del resultado puede ser entre 24 y 72 h o incluso días según el lugar donde se encuentre ubicado el paciente [8].

Existen pruebas rápidas como las de detección de antígeno y anticuerpos asociados con la infección por el virus, estas pruebas se consideran fáciles de usar y menos costosas que

las pruebas de RT-qPCR en tiempo real. Un resultado positivo en una prueba rápida se considera muy exacto, sin embargo, la principal desventaja de los ensayos serológicos es su baja sensibilidad, ya que suelen presentarse casos de falsos negativos, por ende, es necesario una prueba confirmatoria por RT-qPCR, repercutiendo en un incremento de los costos asociados, así, su utilidad puede ser limitada para el diagnóstico, ya que requiere que el paciente desarrolle un nivel detectable de anticuerpos y esto puede tardar varios días e incluso semanas [4, 8].

Las estrategias para la detección temprana de SARS-CoV-2 suelen ser la principal limitante para controlar el contagio, esto ocurre con frecuencia en países en desarrollo como Colombia, Perú y Ecuador. La identificación eficaz de los casos de infección es un reto que evidencia la necesidad de implementar métodos de diagnósticos rápidos y precisos en detección temprana, que puedan complementar las estrategias propuestas por las autoridades sanitarias para hacer frente a la rápida propagación del virus [13].

Para dar respuesta a esa problemática, países latinoamericanos como Uruguay y Argentina han avanzado en la implementación del método LAMP (por sus siglas en inglés *loop mediated isothermal amplification*) como una nueva alternativa diagnóstica para la enfermedad, ya que es económica, accesible y puede ser fácilmente utilizada en todo el país empleando infraestructura de baja complejidad [13].

El método LAMP, desarrollado por Notomi *et al.* [14], es un método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que ha sido aplicado a la detección de patógenos tales como virus y bacterias [15], presenta sensibilidad diagnóstica y especificidad similar al método estándar (RT-qPCR), debido a que emplea cebadores específicamente diseñados y una ADN polimerasa (*Bst*) aislada de *Bacillus stearothermophilus*, con actividad de desplazamiento de cadena [10, 16, 17].

A partir de la secuencia a amplificar, previamente, las 6 regiones de reconocimiento de los cebadores deben ser diseñadas, la etapa de amplificación lineal comienza con la hibridación del cebador doble FIB o BIP (por sus siglas en inglés *Forward Inner Primer* y *Backward Inner Primer*) en el extremo 5' o 3', respectivamente, los cuales están diseñados para facilitar el acoplamiento y copia de la región de interés con sus regiones complementarias, formando estructuras tipo bucle que funcionan como moldes para la etapa cíclica de amplificación. Los cebadores externos (F3 y B3, por sus siglas en inglés *Forward outer Primer* y *Backward outer Primer*) abarcan la región completa de amplificación y permiten generar copias de la cadena original. Además, se emplean dos cebadores denominados FLB y BLP (por sus siglas en inglés *Forward LOOP Primer* y *Backward LOOP Primer*) que aceleran el proceso de amplificación y ayudan a mantener la estabilidad de las cadenas [14, 16, 18].

La lectura de los resultados puede realizarse de dos formas. I) Cuantitativa: empleando un turbidímetro para lectura en tiempo real. II) Cualitativa: detectando la turbidez, ya sea mediante el uso de agentes fluorescente como SYBR Green [19], el uso de indicadores de iones metálicos fluorescentes [16, 20] como el azul de hidroxinaftol y la calceína o el uso de indicadores de cambio de pH, entre otros [19, 21], tales como el rojo fenol que varía de color rosado a pH 8,8 con viraje a color amarillo cuando el pH disminuye por debajo de 6,2 [17, 22], este último es el método de detección predilecto, pues evita el uso de equipos adicionales o especializados.

Durante la síntesis de nuevas cadenas de ADN, la *Bst* polimerasa cataliza el crecimiento de la cadena en dirección 5' - 3', creando enlaces fosfodiéster entre los dNTPs de la cadena naciente, generando la liberación de pirofosfatos de magnesio ($Mg_2P_2O_7$), esta acumulación ocasiona un cambio en el pH de la reacción, debido a la disminución en la concentración de los iones de magnesio [16, 19, 21, 22].

Entre las ventajas del método LAMP se encuentran el procesamiento de las muestras a una temperatura constante entre 60 y 65 °C, la amplificación del ADN blanco en menos de 30 min [16, 22-24], la exclusión de un termociclador como equipo robusto y un resultado de prueba rápido y confiable, ya que tiene una sensibilidad y especificidad similar e incluso superior a la qPCR, por lo que puede ser una técnica que ofrece una mayor capacidad diagnóstica para responder a las necesidades surgidas en una pandemia [24].

Una de las variantes del método LAMP es el método RT-LAMP (por sus siglas en inglés *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*), en el cual se agrega una enzima transcriptasa a la mezcla de reacción. Esta enzima permite la conversión del ARN viral en ADN complementario, el cual será utilizado como molde para la amplificación. Este método tiene un gran potencial en la detección del virus, como lo demostraron Huang *et al.* [17], Buck *et al.* [24] y Lamb *et al.* [25], quienes reportaron una prueba rápida de LAMP para la detección de SARS-CoV-2 en un tiempo de reacción de 30 min para la amplificación del gen *N*, evidenciando una alta especificidad de los cebadores diseñados, ya que al evaluar virus como MERS, MHV y BtCoV (por sus siglas en inglés *Middle East respiratory syndrome*, *Mouse Hepatitis Virus* and *Bat coronavirus* respectivamente) no se obtuvieron señales de amplificación [24, 25].

En el presente estudio se evaluó y comparó el límite de detección del método LAMP con respecto al método estándar RT-qPCR y el uso de la RT-LAMP como alternativa para la detección del gen *N* del SARS-CoV-2. La detección de la cantidad mínima de copias del gen viral en la prueba LAMP fue evaluada en un plásmido sintético denominado

plásmido Covid+. Se evaluó la aplicabilidad del método RT-LAMP en el diagnóstico de muestras clínicas de SARS-CoV-2 en 25 muestras de pacientes colombianos, explorando su uso potencial en el diagnóstico molecular en Colombia.

METODOLOGÍA

Recolección y procesamiento de muestras clínicas

Se realizó un estudio descriptivo transversal. En el marco del proyecto “Generación de la capacidad técnica para fabricación mediante procesos biotecnológicos de reactivos y versiones *in house* de kits diagnóstico” desarrollado por el Laboratorio de Caracterización Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), Sede Bogotá; se realizó, previo consentimiento informado, la toma de 25 hisopados nasofaríngeos a adultos mayores de edad, con y sin síntomas de infección respiratoria aguda, que autorizaron la inclusión de sus muestras para el desarrollo del presente estudio. Las muestras fueron colectadas en medio de transporte viral universal y fueron debidamente transportadas y almacenadas hasta su posterior procesamiento.

La extracción de ARN viral se realizó utilizando el MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA Extraction Kit® según las indicaciones del fabricante. Alícuotas de 20µL de ARN viral eluido fueron usadas en el protocolo estándar para el diagnóstico de SARS-CoV-2, por RT-qPCR y almacenadas a -80 °C hasta la realización de los ensayos posteriores [12].

El estudio se ajustó a las buenas prácticas de laboratorio según los estándares internacionales y el uso de muestras clínicas fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la misma universidad. Todas las muestras fueron manipuladas e inactivadas siguiendo las prácticas, técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones adecuadas para el manejo de muestras biológicas de nivel 3.

LAMP para SARS-CoV-2

Las reacciones de RT-LAMP para la amplificación del gen *N*, que codifica para la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2, se llevaron a cabo empleando un grupo de cebadores específicos reportados por Buck *et al.* [24] y Zhang *et al.* [26] y el kit comercial WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (ADN & ARN M1800) (NEB) (tabla 1), el cual contiene una polimerasa *Bst* 2.0 con actividad de desplazamiento de cadena y una solución de reacción especial optimizada, que incluye rojo fenol como indicador de pH.

Tabla 1. Secuencias de cebadores del gen *N*.

Método	Cebador	Secuencia 5' - 3'
RT-LAMP	FIP	TCTGGCCCAGTTCCTAGGTAGTCCAGACGAATTC-GTGGTGG
	BIP	AGACGGCATCATATGGGTTGCACGGGTGCCAAT-GTGATCT
	LOOP F	GGACTGAGATCTTTTCATTTTACCGT
	LOOP B	ACTGAGGGAGCCTTGAATACA
	F3	TGGCTACTACCGAAGAGCT
	B3	TGCAGCATTGTTAGCAGGAT
RT-qPCR	N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC
	N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG
	N_Sarbeco_P1	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ

El volumen de la mezcla de reacción fue de 12.5 μL (2X tampón de amplificación isotérmica del kit WarmStart Colorimetric LAMP); 10X de mezcla de cebadores (FIP, 16 μM ; BIP, 16 μM ; F3, 2 μM ; B3, 2 μM ; LF, 4 μM ; LB, 4 μM) previamente preparados y 2,5 μL de ARN molde (cuantificado con el kit QubitTM RNA HS Assay), concentración de 7 ng/ μL ; agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas hasta completar volumen [24-26].

Las reacciones se prepararon sobre hielo y, posteriormente, se incubaron a 65 °C durante 30 min. Los ensayos fueron realizados por triplicado, como control negativo se empleó agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas y como controles positivos, un plásmido previamente caracterizado denominado PR y una muestra clínica de ARN denominada (IB351), positiva para el virus SARS-CoV-2. La prueba fue evaluada por detección visual y considerada positiva al comparar la diferencia en el color con respecto al control negativo. Con estas condiciones de ensayo, se realizaron pruebas preliminares para evaluar la presencia del gen *N* en el plásmido Covid+.

RT-qPCR para SARS-CoV-2

Las condiciones de amplificación para este método se modificaron a partir del protocolo descrito por Corman *et al.* [12], para el diagnóstico y detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Se utilizó el kit comercial KiCqStartTM One-Step Probe RT-qPCR ReadyMixTM Sigma Aldrich®, se emplearon los cebadores y la sonda reportados para la amplificación del gen *N* del SARS-CoV-2 (tabla 1).

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 10 μL : 2,5 μL de ARN molde, 5 μL del tampón de reacción 2X, 0,75 μL de primer F1 (10 μM), 1 μL de primer R1 (10 μM) y 0,25 μL de sonda (10 μM). El plásmido denominado Covid+ fue empleado como control positivo de amplificación y como control negativo se empleó agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

La transcripción reversa se realizó a 55 °C durante 5 min., la amplificación a 94 °C durante 1 min para la activación inicial de la PCR, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 10 segundos y 58 °C por 10 s. Con un ciclo adicional de 40 °C durante 30 s (total 50 min.). El ensayo se desarrolló en el equipo de tiempo real LightCycler® 480 (Roche).

Evaluación del límite de detección

El límite de detección del método LAMP y la qPCR fueron determinados usando diluciones seriadas del plásmido sintético COVID+ [15], una vez establecida la concentración del plásmido en la alícuota de trabajo, se calculó el número de copias y se evaluaron diluciones seriadas en un rango desde 182 millones de copias hasta ~1 copia por reacción (tabla 2). Estas diluciones fueron dispuestas por triplicado en tubos cónicos de 500 µL. Se realizó la lectura de los resultados según las especificaciones del método evaluado.

Tabla 2. Concentración de plásmido por factor de dilución.

Dilución	Factor de dilución	Concentración (ng/µL)	Número de copias de plásmido
1	1/10	7	182 424 242
2	1/100	7×10^{-1}	18 242 424
3	1/1000	7×10^{-2}	1 824 242
4	1/10 000	7×10^{-3}	182 424
5	1/100 000	7×10^{-4}	18 242
6	1/1 000 000	7×10^{-5}	1 824
7	1/10 000 000	7×10^{-6}	182
8	1/100 000 000	7×10^{-7}	18
9	1/1 000 000 000	7×10^{-8}	1,8

Ensayos RT-LAMP en muestras clínicas de ARN de pacientes para diagnóstico de SARS-CoV-2

La correlación del método RT-LAMP para el diagnóstico de SARS-CoV-2 se calculó comparando el resultado de la amplificación del gen *N* en 25 muestras clínicas de pacientes colombianos por el método RT-qPCR. Las muestras fueron previamente diagnosticadas por RT-qPCR así: 17 muestras positivas y 8 muestras negativas para el gen *E* del virus SARS-CoV-2 y empleado el gen *RNaseP* como control interno. Este último fue positivo para todas las muestras (datos no mostrados).

El ensayo de RT-LAMP se realizó en una mezcla de reacción de 12,5 µL que contenía 2X tampón de amplificación isotérmica del kit WarmStart Colorimetric LAMP; 10X de mezcla de cebadores (FIP, 16 µM; BIP, 16 µM; F3, 2 µM; B3, 2 µM; LF, 4 µM; LB, 4 µM) previamente preparados y 2,5 µL de ARN extraído de los hisopados de los

pacientes, agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas hasta completar volumen. La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 min. en un baño seco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia del gen N en el plásmido COVID+ con el método LAMP

Se confirmó la presencia del gen *N* en el plásmido sintético COVID+, desarrollando una prueba piloto con los reactivos de LAMP como se describe en la metodología. El cambio de color en la mezcla de reacción después de la incubación evidenció la presencia del gen *N* en el plásmido COVID+.

El resultado obtenido en la muestra ARN IB351 fue considerado positivo, lo que es consistente con lo reportado por Keller *et al.* (2020) [22], quienes evidenciaron variaciones en las tonalidades del indicador de color asociadas al cambio de pH en la solución de reacción en presencia de la hebra molde y la enzima. Así, los controles tanto positivo (PR y ARN IB351) como negativo (agua) se encuentran dentro de las especificaciones del ensayo (figura 1).

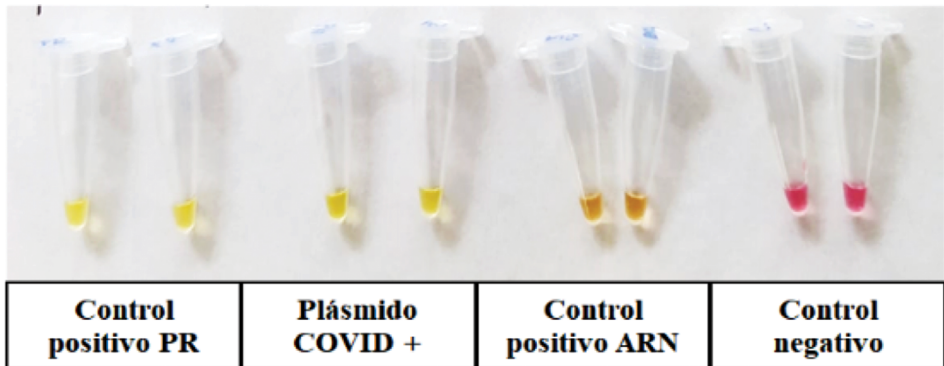


Figura 1. Prueba preliminar gen *N*-LAMP en plásmido COVID+

Evaluación del límite de detección

Los resultados de la evaluación del límite de detección del gen *N* por el método LAMP, con la curva realizada a partir de las diluciones seriadas del plásmido COVID+, fueron determinados de manera visual, demostrando que 7×10^{-7} ng/ μ L de plásmido, equivalente a ~ 18 copias del gen *N*, pueden ser amplificadas en un nivel detectable en 30 min (figura 2), esta es la concentración más baja donde un positivo pudo ser detectado por el cambio de color en la reacción. Los controles negativos se encuentran dentro de las especificaciones del ensayo.

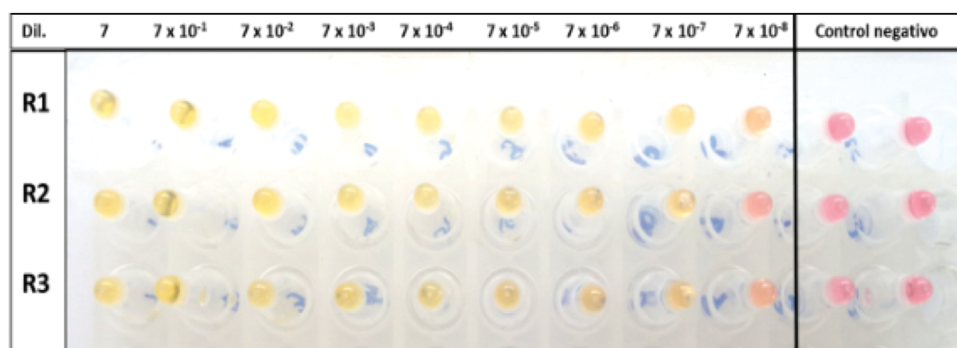


Figura 2. Evaluación del gen *N*-LAMP en el plásmido COVID+. R1: réplica 1; R2: réplica 2; R3: réplica 3.

Los resultados de la evaluación del límite de detección del gen *N* por el método de qPCR fueron establecidos mediante los valores CP calculados en el ensayo de detección de este gen a partir de las diluciones del plásmido COVID+ (tabla 3). Según el método lineal de la curva estándar, la concentración de las muestras detectadas se encontraba en un rango entre 9,66 hasta $5,55 \times 10^{-7}$ ng/ μ L aproximadamente. Los datos obtenidos sugieren reproducibilidad en cada uno de los puntos evaluados.

Tabla 3. Valores CP calculados en el ensayo gen *N*-qPCR de las diluciones del plásmido COVID+

Concentración ng/ μ L plásmido	Réplica 1 CP	Réplica 2 CP	Réplica 3 CP	Concentración
7	10,19	10,10	10,08	9,66
7×10^{-1}	13,85	14,25	14,12	$5,99 \times 10^{-1}$
7×10^{-2}	17,83	17,75	17,89	$5,74 \times 10^{-2}$
7×10^{-3}	21,07	21,12	21,33	$5,97 \times 10^{-3}$
7×10^{-4}	24,63	24,69	24,82	$5,45 \times 10^{-4}$
7×10^{-5}	27,1	27,49	27,39	$8,31 \times 10^{-5}$
7×10^{-6}	30,83	30,94	30,97	$8,25 \times 10^{-6}$
7×10^{-7}	32,96	32,89	32,2	$5,55 \times 10^{-7}$
7×10^{-8}	N/D	N/D	N/D	N/A
Control negativo	N/D	N/D	N/D	N/A

N/D: no detectado. N/A: no aplica

Los resultados obtenidos de la comparación del límite de detección de ambos métodos para la amplificación del gen *N*, realizados a partir de las diluciones seriadas del plásmido COVID+ se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación del límite de detección del método LAMP y qPCR.

Concentración ng/ μ L plásmido	LAMP	qPCR	Número de copias de plásmido
7	+	+	182 424 242
7×10^{-1}	+	+	18 242 424
7×10^{-2}	+	+	1 824 242
7×10^{-3}	+	+	182 424
7×10^{-4}	+	+	18 242
7×10^{-5}	+	+	1824
7×10^{-6}	+	+	182
7×10^{-7}	+	+	18
7×10^{-8}	-	-	1,8

T2 RT-LAMP y RT-qPCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2

Una vez realizada la RT-LAMP en las 25 muestras de hisopado nasofaríngeo, el indicador de pH (rojo fenol) permitió evidenciar a simple vista, que 17 de las muestras evaluadas mostraron cambio de color rosa a amarillo, resultado que indicó la amplificación del gen *N* con el método RT-LAMP, mientras el control negativo y las muestras restantes mantuvieron el color rosa (figura 3). Estos resultados fueron comparados con el método estándar RT-qPCR (tabla 5), se obtuvo una concordancia del 100 % entre los dos métodos para el gen *N*, lo cual demuestra que la sensibilidad diagnóstica de RT-LAMP fue del 100% con una tasa de falsos negativos y falsos positivos de 0 % de acuerdo con el diagnóstico previamente realizado por RT-qPCR para el gen *E* (datos no mostrados).

La mayoría de las pruebas de diagnóstico a nivel mundial se realizan con el método de RT-qPCR, se amplifica el ARN viral obtenido a partir de muestras nasofaríngeas. Sin embargo, frente a la continua demanda global y la competencia por reactivos y recursos, con el objeto de minimizar la dependencia de cualquier metodología, en este estudio hemos descrito el procedimiento para utilizar RT-LAMP como un método rentable, sensible, alternativo, de alto rendimiento y con resultados similares a los obtenidos por RT-qPCR para detectar SARS-CoV-2 en muestras clínicas.

Fueron empleados los cebadores diseñados para la amplificación del gen *N* de la nucleocápside del SARS-CoV-2, reportados por Zhang *et al.* [26] y previamente evaluados por Buck *et al.* [24] quienes reportaron correlación total entre los resultados obtenidos en RT-qPCR y RT-LAMP; confirmaron la especificidad y posible reactividad cruzada con ARN humano del juego de cebadores, además de evaluar la especificidad, en muestras clínicas negativas para SARS-CoV-2 previamente inoculadas con 14 tipos de virus

como Mers-CoV, influenza A y B, algunas cepas de coronavirus estacionales, metapneumovirus (MPV), virus sincitial respiratorio (RSV) y virus parainfluenza tipo 3 y 4 (PIV3, PIV4). En ninguno de los ensayos de RT-LAMP con el gen *N* se obtuvo señal de amplificación, confirmando la especificidad de los cebadores para SARS-CoV-2.

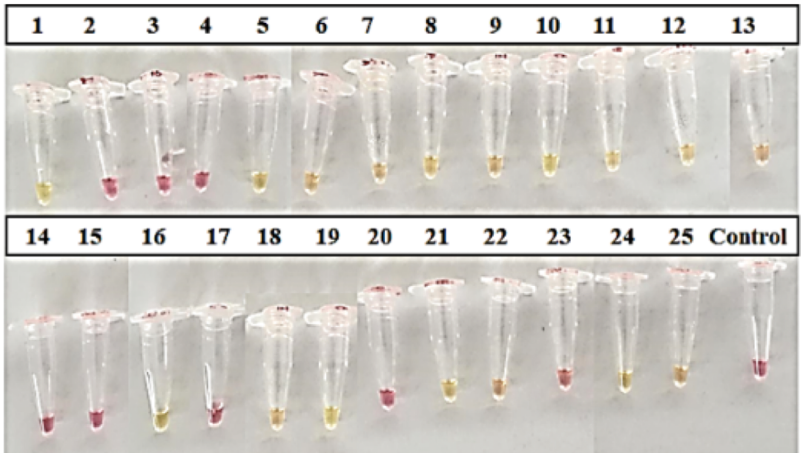


Figura 3. Detección del gen *N* de SARS-CoV-2 por RT-LAMP en muestras clínicas de pacientes colombianos.

Tabla 5. Aplicación del método RT-LAMP para la detección del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.

Tubo N.º	Muestras	qPCR CP	+/-	RT-LAMP	Tubo N.º	Muestras	qPCR CP	+/-	RT-LAMP
1	IB202	25,75	+	A	14	IC915	N/D	-	R
2	IB276	N/D	-	R	15	IC581	N/D	-	R
3	IB266	N/D	-	R	16	IC432	33,24	+	A
4	IC185	N/D	-	R	17	ID450	N/D	-	R
5	IB344	33,40	+	A	18	ID548	25,52	+	A
6	IB350	31,83	+	A	19	ID684	32,99	+	A
7	IB478	22,00	+	A	20	ID792	N/D	-	R
8	IB690	22,85	+	A	21	ID888	19,90	+	A
9	IB858	24,79	+	A	22	ID913	33,44	+	A
10	IB999	31,95	+	A	23	IE078	N/D	-	R
11	IB896	32,63	+	A	24	IE171	33,12	+	A
12	IC163	33,48	+	A	25	IE278	33,18	+	A
13	IC173	32,97	+	A	Control	C-	N/D	-	R

A: amarillo. R: rosa. N/D: no detectado

El límite de detección del método LAMP fue de ~ 18 copias del gen *N* por 12,5 μL de reacción, igual al reportado para la RT-qPCR, sugiriendo que este método es igual de sensible al método estándar para la detección de SARS-CoV-2. Estos resultados son equiparables a los descritos por Ganguli *et al.* [27], quienes obtuvieron un límite de detección de RT-LAMP equivalente a los obtenidos con RT-qPCR (50 copias por μL de reacción). Renfei *et al.* [28] señalaron que la RT-LAMP detectó una cantidad de 30 copias en 25 μL de reacción, ligeramente más bajo que la RT-qPCR para el gen RdRp (gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus SARS-CoV-2).

El desempeño del método RT-LAMP, usando muestras clínicas de ARN positivas para SARS-CoV-2, determinó una concordancia del 100 % con respecto a la RT-qPCR (CP: 19,9-34,95), con la misma sensibilidad diagnóstica que el método estándar para el gen *N* de SARS-CoV-2 ($p < 0,01$, test de chi cuadrado). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Ganguli *et al.* [27], quienes obtuvieron una sensibilidad del 100 % del método RT-LAMP para el gen *N* en 10 muestras clínicas provenientes de pacientes positivos para el virus. De igual forma Referi *et al.* [28] reportaron una consistencia del 100 % en los datos entre RT-LAMP y RT-qPCR para el gen RdRp en 24 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con la enfermedad.

El tiempo empleado en este estudio para el procesamiento de las muestras clínicas para la detección del gen *N* del SARS-CoV-2 por el método RT-LAMP fue de 30 min., lo cual corresponde a lo reportado en la literatura [21, 22, 24], constituyendo la principal ventaja frente al tiempo de procesamiento por la técnica estándar RT-qPCR que implica en promedio 120 min.

A partir de los resultados obtenidos y para el número de muestras clínicas evaluadas, puede sugerirse que el ensayo colorimétrico de RT-LAMP permite realizar una detección rápida y confiable del gen *N* del SARS-CoV-2 a partir de hisopados nasofaríngeos de pacientes colombianos, con un límite de detección de aproximadamente 18 copias del gen viral *N*, similar al establecido con la prueba estándar RT-qPCR, aplicada rutinariamente en el Instituto Nacional de Salud de Colombia y que en este estudio se usó como prueba de referencia. Este resultado es comparable con el reportado por Huang *et al.* [17], quienes evaluaron por este método, 8 muestras positivas y 8 muestras negativas registrando como límite de detección para RT-LAMP aproximadamente 80 copias del gen. Los hallazgos encontrados por Tanner *et al.* [21] demostraron que la sensibilidad de la técnica en < 10 copias y la rapidez en < 30 min. para la detección, resultados que son consistentes con los obtenidos en este estudio.

Implementar esta técnica como prueba de diagnóstico diario, permitiría una disminución en los costos operativos, la rápida lectura de los resultados y el incremento del

número de pruebas aplicadas a la población ya que, además de las ventajas mencionadas, al no requerir equipos de alto costo es aplicable en lugares con infraestructura limitada. Es probable que esta metodología dé paso a la aplicación de pruebas en puntos de atención fuera del ámbito del laboratorio de diagnóstico clínico, ampliando la expectativa de ser validado por las autoridades sanitarias competentes, tal como está ocurriendo en países de Latinoamérica.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. M.M. Oliva-Martínez, La COVID-19; pandemia del siglo XXI, *MediMay, Revista de Ciencias Médicas de Mayabeque*, **27**(2), 99-103 (2020).
2. Instituto Nacional de Salud Ministerio de Salud y Protección social, *Coronavirus (COVID-19Covid-19)*, URL: http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/Covid-19_copia.aspx, consultado en noviembre de 2020.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS), *Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard*, URL: <https://covid19.who.int>, consultado en noviembre de 2020.
4. B.S. Kamps, C. Hoffmann, Epidemiología. en: *Covid Reference*, Steinhäuser Verlag, España, 2020, pp. 1-111.
5. N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song., *et al.*, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, *New England Journal of Medicine*, **382**(8), 727-733 (2020).
6. F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.M. Chen, W. Wang, Z.G. Song, *et al.*, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature*, **579**(7798), 265-269 (2020).

7. M.L. Holshue, C. DeBolt, S. Lindquist, K.H. Lofy, J. Wiesman, H. Bruce, *et al.*, First case of 2019 novel coronavirus in the United States, *New England Journal of Medicine*, **382**, 929-936 (2020).
8. B. Udugama, P. Kadhiresan, H.N. Kozlowski, A. Malekjahani, M. Osborne, V.Y.C. Li, *et al.*, Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection, *ACS nano*, **14**, 3822-3835 (2020).
9. J.P. Broughton, X. Deng, G. Yu, C.L. Fasching, V. Servellita, J. Singh, *et al.*, CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2, *Nature Biotechnology*, **38**, 870-874 (2020).
10. J. Kashir, A. Yaqinuddin, Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19, *Medical Hypotheses*, **141**, 109786 (2020).
11. V. Corman, M. Müller, U. Costabel, J. Timm, T. Binger, B. Meyer, *et al.*, Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections, *Euro Surveill*, **17**(49), 20334 (2020).
12. V. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D.K.W. Chu, *et al.*, Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Euro Surveill*, **25**(3), 2000045 (2020).
13. Universidad de la República Uruguay, *Nuevo test diagnóstico de COVID-19*, URL: [http:// https://udelar.edu.uy/portal/2020/08](http://https://udelar.edu.uy/portal/2020/08), consultado en noviembre de 2020.
14. T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research*, **28**(12), 63 (2000).
15. J. Hill, S. Beriwal, I. Chandra, V.K. Paul, A. Kapil, T. Singh, *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*, *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(8), 2800-2804 (2008).
16. N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, T. Notomi, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nature Protocols*, **3**(5), 877-882 (2008).
17. W.E. Huang, B. Lim, C.C. Hsu, D. Xiong, W. Wu, Y. Yu, *et al.*, RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2, *Microbial Biotechnology*, **13**(4), 950-961 (2020).

18. M. Parida, S. Sannarangaiah, P. Dash, P.V.L. Rao, K. Morita, Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, *Reviews in Medical Virology*, **18**(6), 407-421 (2008).
19. M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, K.I. Hanaki, Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue, *Biotechniques*, **46**(3), 167-172 (2009).
20. A. Srisrattakarn, A. Lulitanond, C. Wilailuckana, N. Charoensri, L. Wonglakorn, P. Saenjamlá, *et al.*, Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla NDM, bla OXA-48, bla VIM, bla IMP-14 and bla KPC groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33**(7), 130 (2017).
21. N.A. Tanner, Y. Zhang, T.C. Evans, Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes, *Biotechniques*, **58**(2), 59-68 (2015).
22. M.J. Kellner, J.J. Ross, J. Shnabl, M.P.S. Dekens, R. Heinen, I. Grishkovskaya, *et al.*, A rapid, highly sensitive and open-access SARS-CoV-2 detection assay for laboratory and home testing, *bioRxiv preprint* (2021). Doi: 10.1101/2020.06.23.166397
23. J. Rubinfien, K.D. Atabay, N.M. Nichols, N.A. Tanner, J.A. Pezza, M.M. Gray, *et al.*, Nucleic acid detection aboard the International Space Station by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *FASEB BioAdvances*, **2**(3), 160-165 (2020).
24. M.D. Buck, E.Z. Poirier, A. Cardoso, B. Frederico, J. Canton, S. Barrell, *et al.*, Standard operating procedures for SARS-CoV-2 detection by a clinical diagnostic RT-LAMP assay, *medRxiv preprint* (2021). Doi: 10.1101/2020.06.29.20142430
25. L.E. Lamb, S.N. Bartolone, E. Ward, M.B. Chancellor, Rapid detection of novel coronavirus (COVID19) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, *medRxiv preprint* (2021). Doi: 10.1101/2020.02.19.20025155
26. Y. Zhang, N. Odiwuor, J. Xiong, L. Sun, R. Nyaruaba, H. Wei, N.A. Tanner, Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP, *medRxiv preprint* (2021). Doi: 10.1101/2020.02.26.20028373

27. A. Ganguli, A. Mostafa, J. Berger, M. Aydin, F. Sun, S. Ramirez, *et al.*, Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**(37), 22727-22735 (2020).
28. R. Lu, X. Wu, Z. Wan, Y. Li, L. Zuo, J. Qin, *et al.*, Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2, *Virologica Sinica*, **35**, 344-347 (2020).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.E. Méndez-Tibambre, Z.J. Rodríguez-Parra, D.D. Portela-Dussan, M.F. Bustamante-Restrepo, F.A. Aristizábal-Gutiérrez, Método LAMP como alternativa diagnóstica para la detección del virus SARS-CoV-2, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 633-649 (2021).

Estudo prospectivo tecnológico e científico de antissépticos para prevenir a disseminação de SARS-CoV-2 e outros vírus patogênicos

Robson Almeida Silva^{1a}, Fabiany Cruz Gonzaga^{1b}, Gisele Moraes de Jesus^{2c}

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Rodovia 415, Km 03, SN, Itapetinga-Ba, 45700-000, Brasil.

² Universidade Federal da Bahia, R. Barão de Jeremoabo, 147, Ondina, Salvador-BA, 40170-115, Brasil.

Correios eletrônicos:

^a robsonalmeida74@gmail.com

^b fabianycruz@uesb.edu.br

^c Giselemoraes.89@hotmail.com

Recebido: 24 de setembro de 2020

Revisado: 18 de março de 2020

Aceto: 22 de março de 2020

RESUMO

Introdução: o coronavírus identificado em humanos, o SARS-CoV-2, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a definir o COVID-19 como uma pandemia. Essa classificação se deve à sua disseminação em diversos países, o que mostra a transmissibilidade desse vírus. O controle da doença exigia isolamento social e observação do que seria o principal meio de disseminação: as mãos. A assepsia destes passou a ser destacada e as substâncias utilizadas para ela foram questionadas. **Objetivo:** este trabalho é uma análise qualitativa e quantitativa de artigos e patentes da etapa de estudos sobre o desenvolvimento de formulações antissépticas para controle da disseminação de vírus. **Resultados:** a análise do banco de dados revelou que há poucos estudos sobre eficácia antisséptica antiviral e existência limitada de tecnologia aplicada. **Conclusão:** o controle da pandemia causada pelo SARS-CoV-2 exigirá o desenvolvimento e validação de meios anti-sépticos.

Palavras-chave: Pandemia, antissépticos, SARS-CoV-2.

RESUMEN

Estudio prospectivo tecnológico y científico de antisépticos para prevenir la propagación de SARS-CoV-2 y otros virus patógenos

Introducción: el coronavirus identificado en humanos, SARS-CoV-2, hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) definiera al COVID-19 como una pandemia. Esta clasificación se debe a su diseminación en varios países, lo que muestra la transmisibilidad de este virus. El control de la enfermedad requirió el aislamiento social y la observación de lo que sería el principal modo de propagación: las manos. Se empezó a destacar la asepsia de estas y a cuestionar las sustancias utilizadas para ello. **Objetivo:** este trabajo es un análisis cualitativo y cuantitativo de artículos y patentes de la etapa de estudios sobre el desarrollo de formulaciones antisépticas para controlar la propagación de virus. **Resultados:** el análisis de las bases de datos reveló que hay pocos estudios sobre la eficacia antiséptica antiviral y existencia limitada de tecnología aplicada. **Conclusión:** el control de la pandemia provocada por el SARS-CoV-2 demandará el desarrollo y validación de medios antisépticos.

Palabras clave: Pandemia, antisépticos, SARS-CoV-2.

SUMMARY

Prospective technological and scientific study of antiseptics to prevent the spread of SARS-CoV-2 and other pathogenic viruses

Introduction: the coronavirus identified in humans, SARS-CoV-2, caused the World Health Organization (WHO) to define COVID-19 as a pandemic. This classification is due to its dissemination in several countries, which shows the transmissibility of this virus. Controlling the disease required social isolation and observation of what would be the main mode of spread: the hands. The asepsis of these began to be highlighted and the substances used for it were questioned. **Objective:** this work is a qualitative and quantitative analysis of articles and patents from the stage of studies on the development of antiseptic formulations to control the spread of viruses. **Results:** database analysis revealed that there are few studies on antiviral antiseptic efficacy and limited existence of applied technology. **Conclusion:** the control of the pandemic caused by SARS-CoV-2 will require the development and validation of antiseptic means.

Keywords: Pandemic, antiseptics, SARS-CoV-2.

INTRODUÇÃO

Desde o Iluminismo e, posteriormente, a Revolução Industrial e Francesa, o caráter científico se acentuou-se expressivamente nas sociedades. Nesta perspectiva, é de suma importância ressaltar que a informação, principalmente relativa à tecnologia cumpre um papel fundamental na gestão estratégica de centros de pesquisa, desenvolvimento e inovação e, corroborando constantemente o processo epistemológico da ciência. Não obstante, ao se retratar do caráter científico atual, vive-se uma crise pandêmica declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) perante o novo coronavírus, causando a doença COVID-19, ou doença respiratória de 2019-n-COV caracterizada por infecção respiratória aguda (IRA) e nos casos de maiores consequências a síndrome respiratória aguda grave (SARS), causada pelo SARS-CoV-2. Este é um dos sete coronavírus identificados, sendo assim como o MERS-CoV que foi identificado em 2012 como a causa da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e o SARS-CoV foi identificado em 2002 como a causa de um surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS), os causadores de doenças em humanos [1-6].

Os vírus são considerados os agentes etiológicos predominantes em IRA, sejam como patógenos principais ou predispondo indivíduos a infecções bacterianas secundárias. Manifestações clínicas graves associadas a doenças do trato respiratório inferior são frequentemente observadas em indivíduos com fatores de risco tais como: cardiopatia, pneumopatia e outras condições crônicas como diabetes, obesidade e asma [7]. E são o microrganismo responsáveis pela COVID-19.

A doença COVID-19 fez a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar o novo coronavírus (SARS-CoV-2) uma pandemia devido ao alcance de grande região geográfica [8]. Outras doenças infecciosas ao longo da história da sociedade têm se classificado dessa forma sendo destaque as enfermidades de características virais tal como: a gripe espanhola (1908-1909) emergente na gripe suína (2009) causada pelo vírus H₁N₁ e o ebola [9], bastante noticiadas. As patologias associadas a pandemias destacam-se pela imprevisibilidade, estando associada ao surgimento de fatores múltiplos e complexos que criam condições para o aumento da proporção de populações atingidas ou elevam a sua exposição aos agentes [10]. As doenças de escala global têm de característica principal a fácil disseminação por circulação de pessoas ou objetos infectados [11]. Outra difusão preocupante acontece entre os profissionais que agem diretamente sobre as pessoas acometida pelo patógeno, os trabalhadores da área de saúde. A fim de reduzir os impactos nestes o uso dos antissépticos no controle da difusão de microrganismos é essencial.

A OMS define como antissépticas substâncias que desinfetam, inibindo parcialmente ou totalmente, o desenvolvimento de microrganismos sobre tecidos vivos sem causar

danos [11, 12]. O desenvolvimento e produção de insumos antissépticos [13] são partes importantes no enfrentamento de crises de saúde coletiva em emergências. No caso da COVID-19, as identificações de alternativas antissépticas favorecem a adoção de medidas de prevenção, o que favorece na redução da contaminação comunitária pois a doença é de forte transmissão por contato próximo ou por secreções produzidas durante os episódios de tosse, espirros e coriza quando comparada a outras apresentações do coronavírus [14]. Os antissépticos, portanto, são parte de uma ação de promoção da saúde pública pela higienização das mãos e parte da etiqueta social respiratória.

A *Guia de higiene das mãos e cuidados da saúde* indica alguns compostos da família química do álcool (etanol e n-propanol), o cloroxilenol, clorexidina, hexaclorofeno, iodo e iodóforos, triclosan e compostos quaternários de amônio em soluções em concentrações específicas combinados ou não [11, 12]. A eficiência deste frente aos possíveis patógenos é apresentado conforme a tabela 1.

A ação dos antissépticos se apresentaram significativa de um modo geral para bactérias, no entanto limitada para esporos e vírus. Esse último grupo de microrganismos o estudo indicou poucas informações e dos caracterizado concentrando-se os resultados entre ruim a moderado. A identificação de novas substâncias para aplicação e o estudo de eficiência dos antissépticos existentes é parte da construção da estrutura de apoio para enfrentamento da disseminação de doenças infecciosas como à COVID-19 [12].

Esse trabalho busca fazer o levantamento de artigos e patentes referentes a substâncias e formulações de aplicação antisséptica já identificados para a possível aplicação no auxílio do controle do vírus SARS-Cov-2, colaborando para o direcionamento estratégico e estudos de novos compostos.

METODOLOGIA

A pesquisa de produções científicas relacionadas à temática usou a base ScienceDirect acessando a página 27. O rastreo foi realizado utilizando as palavras de busca da primeira coluna sendo adicionada para busca no título, resumo ou palavras chaves, em combinação individual com as palavras das outras colunas apresentadas na tabela 2. Nesta mostra-se a quantidade de resultados encontrados e observando o instante temporal de descoberta do coronavirus (1960-fevereiro de 2021) [7-17].

Tabela 1. Descrição da eficiência antimicrobiana de compostos antissépticos descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Antisséptico	Bactérias Gram-positiva	Bactérias Gram-negativas	Vírus encapsulados	Vírus não encapsulados	Microbactérias	Fungos	Esporos
Álcoois	+++	+++	+++	++	+++	+++	-
Cloroxidina	+++	++	++	+	+	+-	-
Cloroxilenol	+++	+	+	±	+	+	-
Hexaclorofeno*	+++	+	?	?	+	+	-
Iodóforos	+++	+++	++	++	++	++	±*
Triclosan	+++	++	?	?	±	±*	-
Compostos de quaternário de amônio	++	+	+	+	?	±	-

Legenda: bom = +++, moderado = ++, ruim = +, variável = ±, nenhum = -. * a atividade varia de acordo com a concentração [1, 20, 21].

Tabela 2. Relação de escopo de dados buscados no levantamento bibliográfico.

Palavra de busca	Antimicrobial	Antiviral	Viruses	Corona	COVID-19	Sars-CoV
Antiseptic	3189	265	570	17	146	76
Decontamination <i>human skin</i>	60	4	36	0	5	5
<i>Chemical formulations</i>	6599	1356	4176	443	362	249

Os dados patentários foram buscados na base de dados WorldWide do Escritório Europeu de Patentes (EPO) [18], que compreende mais de 90 países. Foi utilizado o *Software da Microsoft Excel*®, na qual todos os documentos foram traduzidos para a língua inglesa e, posteriormente traduzidos para a língua portuguesa [17]. Os grupos de patentes foram baseados na data de prioridade do primeiro depósito.

A busca de dados foi feita no dia 27 de fevereiro de 2021 após identificado o código A61P31/02 relacionado a classificação de antissépticos locais como o relacionado a temática de estudo. Fazendo-se a combinação do código com as palavras “antimicrobial”, “antiviral”, “corona”, “coronavírus” e “SARS-CoV”, encontrou-se a quantidade de patentes conforme correlacionada na tabela 3. Sendo assim, fez-se uma análise qualifica e quantitativa da progressão tecnológica e das perspectivas para os estudos no campo do desenvolvimento de antissépticos antivirais com foco na identificação de possíveis alternativas para o uso no SARS-CoV-2.

Tabela 3. Relação de quantidade de patentes na base de dados Especenet sobre código A61P31/02 em combinação com as palavras “antimicrobial”, “antiviral”, “coronavírus”, “corona”, “SARS-Cov”.

Palavra-chave	Código: A61P31/02
Antimicrobial	1568
Antiviral	777
Coronavirus	77
Corona	28
SARS-CoV	7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da maturidade tecnológica é um meio de avaliar a permeação na sociedade do conhecimento científico [17] sendo o nível de artigos e patentes estágios iniciais para o desenvolvimento de tecnologias ao alcance de uso na sociedade.

Os resultados de análise de artigos científicos mostraram que o desenvolvimento de antissépticos com foco em vírus corresponde a 1,5 % quando “antiviral” é o termo de busca e cerca de 3,2 % quando o termo de busca é “víroses”, contudo desses apenas 0,4 % têm estudos direcionados para o SARS-CoV, primeiro vírus da família do Coronavírus identificado. Considerando o termo “formulação química” e “antiviral” o resultado é também 7,7 % do presente na base de dados pesquisada. Esse resultado indica limitada quantidade de estudos da identificação de novos e da eficiência de antissépticos frente ao grupo desse vírus mesmo diante dos significativos impactos desses microrganismos na saúde dos surtos que já ocorreram.

A temática antissépticos antiviral tem a quantidade de artigos publicados segundo apresentado na figura 1.

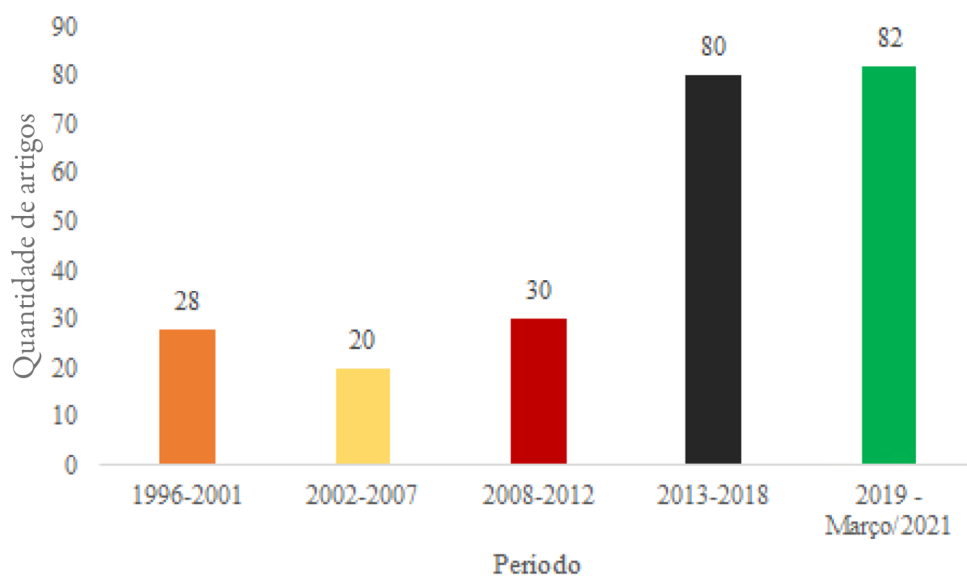


Figura 1. Quantidade de artigos publicados na base de artigos ScienceDirect [18] em intervalos de 5 anos (dados a partir de 1996). Não foram identificados artigos publicados com objeto de estudo antes de 1996.

A figura 1 indica uma ascensão no número de artigos publicados com essa temática. Os dados indicam um crescimento acentuado da busca por informações científicas com a descoberta do MERS-CoV em 2012 quando comparado ao de publicações com a identificação do SARS-CoV em 2002. Esse resultado pode ser consequência de maior preocupação no meio científico devido a maior letalidade do vírus MERS-CoV [19-21].

A prospecção patentária demonstra a transformação da pesquisa em produto tecnológico de acordo com a figura 2.

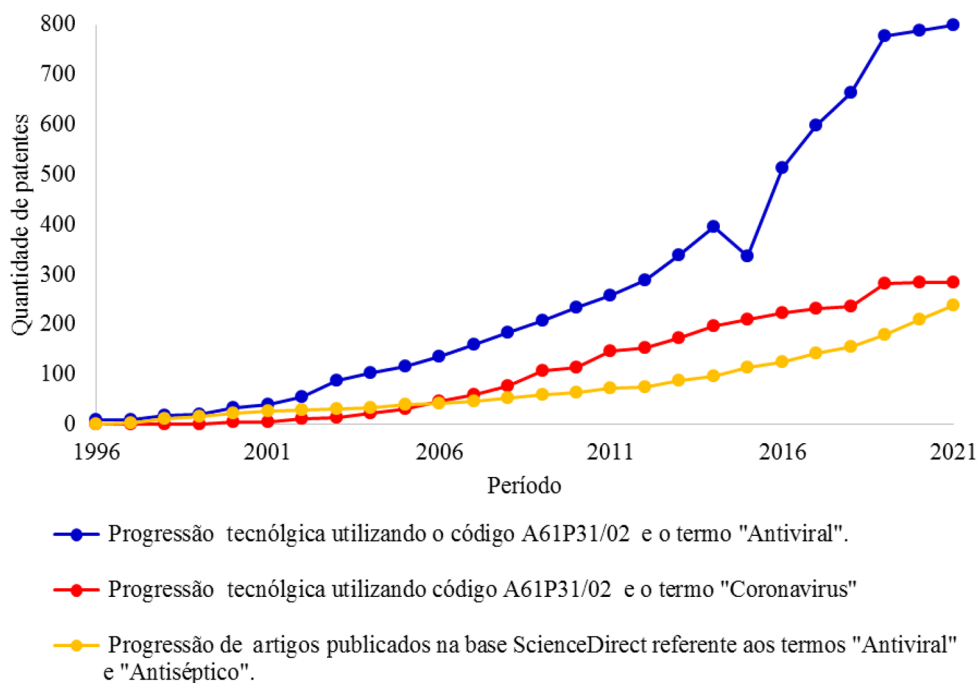


Figura 2. Quantidade de patentes e artigos publicados de modo acumulativo na base de dados Espacenet e ScienceDirect, respectivamente, a partir da pesquisa dos termos antisséptico e antiviral ou antisséptico e coronavírus (dados plotados a partir de 1996 tendo como referência o primeiro artigo disponível da base de dados ScienceDirect).

O desenvolvimento de tecnologia para antisséptico com propriedades antivirais mostra-se em crescimento mais sem uma evolução de características exponenciais, apresentando progressão significativa a partir de 2016 fato que pode ser consequência também do maior número de pesquisas sobre a temática conforme apresentado no gráfico 1. Analisando a combinação do termo de busca “antisséptico” com “antiviral” é possível perceber que até 2016 esse não era objeto de publicação significativa quando comparado ao observado para o período após 2016.

Os países em que foi aplicado à proteção da tecnologia para a temática são apresentados na figura 3.

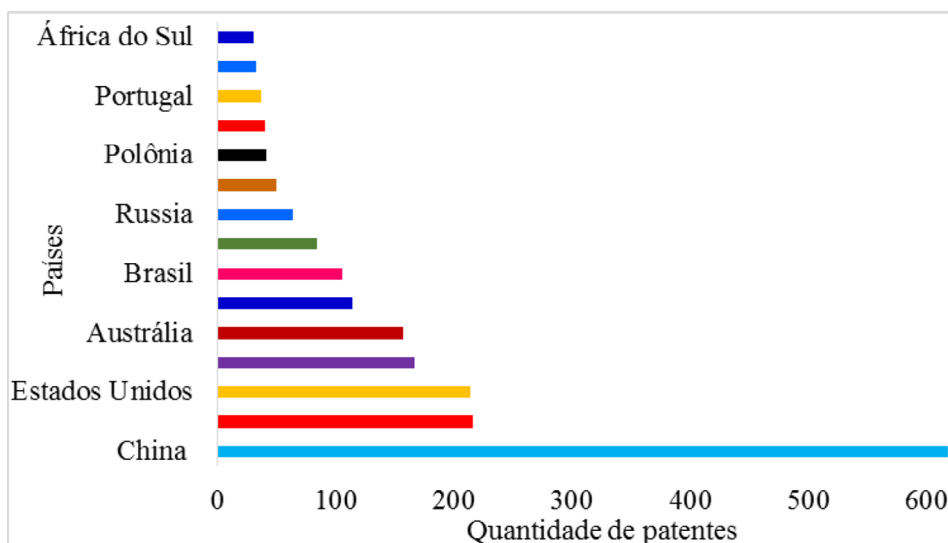


Figura 3. Países aplicantes de proteção tecnológica na forma de patentes à temática antissépticos e antiviral. Destaca-se a maior quantidade de patentes depositadas na China, seguida do Japão e Estados Unidos.

Para esta busca verificou-se no Brasil quantitativos que indicam interesse pela proteção patentária nesta temática. As empresas aplicantes de tecnologia referente a antisséptico com aplicação antiviral segue na figura 4, sendo destacada apenas empresas com mais de uma patente depositada.

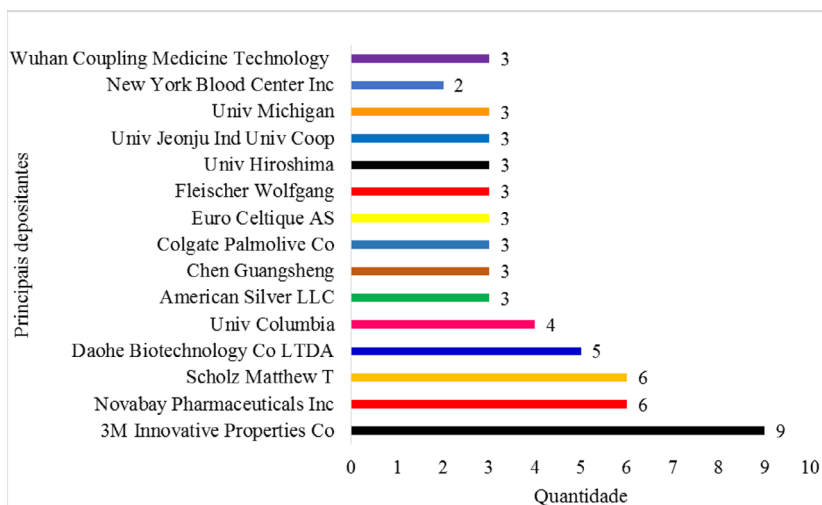


Figura 4. Principais depositantes de patentes relacionadas a tecnologias de produção de antisséptico com ação antiviral.

Entre os dados apresentados na figura 4 destacam-se companhias de tecnologia para a produção de produtos e inventores autônomos, percebendo-se pouca participação de indústrias farmacêuticas na quantidade de pedidos de proteção referente ao tema. Foi identificado as aplicações da tecnologia conforme áreas na figura 5.

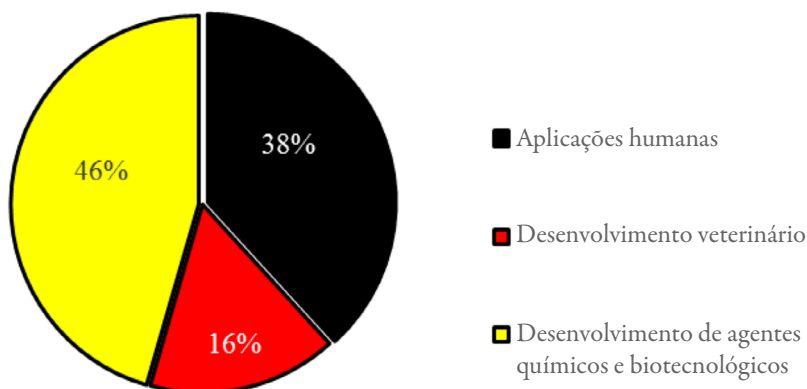


Figura 5. Áreas de aplicação das tecnologias patenteadas a temática antissépticos contra vírus e a quantidade percentual de patentes depositadas.

O estudo das patentes indicou possuir 38 % da quantidade de destas direcionadas à aplicação humana. Observa-se também 16 % para uso veterinário e cerca de 46 % sem definição específica no depósito, de uso humano ou veterinário. Na análise dos títulos observou-se a descrição de 2 patentes para ação específica contra o vírus SARS-CoV-2 que atingem humanos. As áreas de setores desenvolvedores das tecnologias do tema são apresentadas na figura 6.

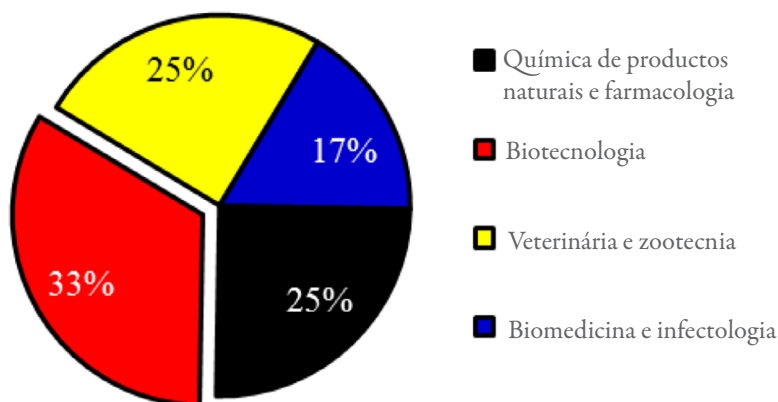


Figura 6. Áreas de setores desenvolvedores de estudos de antissépticos antivirais e as quantidades de patentes depositadas.

O campo da biotecnologia se destaca como setor da maioria das instituições depositantes de patentes com essa temática. A figura 7 demonstra a distribuição de depósito por setores.

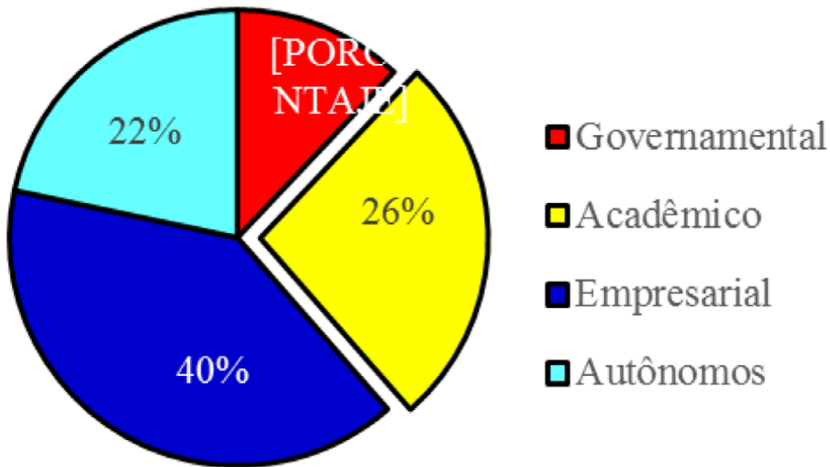


Figura 7. Setores aplicantes de patentes sobre antissépticos antivirais.

Os dados da figura 7 indicam que até o quadro atual o setor empresarial seguido do acadêmico são os que mais se interessam pela proteção da tecnologia.

CONCLUSÃO

O estudo exploratório de artigos científicos e patentes depositadas mostraram que esses encontram-se em estágio inicial no desenvolvimento de tecnologias preventivas com antissépticos antivirais, sendo ainda poucos os dados específicos para o vírus SARS-CoV-2. Os dados patentários indicaram que o desenvolvimento dessa tecnologia esteve associado ao crescimento da demanda social observada com o caso do MERS-CoV.

A distribuição de depósitos de patentes é concentrada em alguns países mostrando que essa não foi uma preocupação global até o presente momento. Os estudos de antissépticos com aplicação antiviral e possível aplicação para o SARS-CoV-2 mostrou-se em estágio inicial. A maioria das patentes identificadas não especificam aplicação humana ou veterinária e há alguma possibilidade de produtos tecnológicos ainda não atribuídos a esse devido a necessidade de identificação de alternativas às tecnologias existentes.

As instituições que mais protegem as tecnologias são o setor empresarial e acadêmico podendo esse fato ser alterado devido a demanda da solução do problema pandêmico causado pelo SARS-CoV-2 requisitar ações de governo.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não têm um conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. A.K. Matsuno, T.B. Gagliardi, F.E. Paula, L.K.S. Luna, B.L.S. Jesus, R.T. Stein, D.C. Aragon, A.P.C.P. Carlotti, E. Arruda, Human coronavirus alone or in co-infection with rhinovirus C is a risk factor for severe respiratory disease and admission to the pediatric intensive care unit: A one-year study in Southeast Brazil, *PLoS One*, **14**(6), 217-744 (2019), DOI: 10.1371/journal.pone.0217744.
2. H.L.d.S. Ferreira, K.L.P. Costa, M.S. Cariolano, G.S. Oliveira, K.K.P. Felipe, E.S.A. Silva, *et al.*, High incidence of rhinovirus infection in children with community-acquired pneumonia from a city in the Brazilian pre-Amazon region, *Journal of Medical Virology*, **91**(10), 1751-1758 (2019), DOI: 10.1002/jmv.25524.
3. H. Trombetta, H.Z. Faggion, J. Leotte, M.B. Nogueira, L.R.R. Vidal, S.M. Raboni, Human coronavirus and severe acute respiratory infection in Southern Brazil, *Pathogen and Global Health*, **110**(3), 113-118 (2016), DOI: 10.1080/20477724.2016.1181294.
4. I. Nunes de Barros, L.D. Pinto, R.B. dos Santos-Kuroda, S. Oliveira de Souza-Silva, L.J. Richtzenhain, C. Wageck-Canal, P.E. Brandão, Canine coronavirus (CCoV), a neglected pathogen: Molecular diversity of S, M, N and 3b genes, *Hosts and Viruses*, **5**(1), 1-6 (2018), DOI: 10.17582/journal.hv/2017/5.1.1.6.
5. L.G. Bentim-Góes, R. Melim-Zerbinati, A.F. Tateno, A. Vieira de Souza, F. Ebach, V.M. Corman, *et al.*, Typical epidemiology of respiratory virus infections in a Brazilian slum, *Journal of Medical Virology*, **92**(8), 1316-131 (2020), DOI: 10.1002/jmv.25636.
6. N. Wang, S.-Y. Li, X.-L. Yang, H.-M. Huang, Y.-J. Zhang, H. Guo, *et al.*, Serological evidence of bat Sars-related coronavirus infection in humans, China, *Virologica Sinica*, **33**(1), 104-107 (2018), DOI: 10.1007/s12250-018-0012-7.
7. A.F. Santos-Nobre, R. Catarina-Medeiros, M. Cordeiro dos Santos, L. Soares, E. Costa Júnior, D. Ferreira-Lima, E.M. Acunã-Souza, W. Alencar de Mello, Primeira detecção de coronavírus humano associado à infecção respiratória aguda na Região Norte do Brasil, *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, **5**(2), 37-41 (2014), DOI: 10.5123/S2176-62232014000200005.

8. D. Mathew, J.R. Giles, A.E. Baxter, D.A. Oldridge, A.R. Greenplate, J.E. Wu, C. Alanio, *et al.*, Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications, *Science*, **369**(6508), eabc8511 (2020), DOI: 10.1126/science.abc8511.
9. A. Iamarino, *H1N1: mais de 90 anos entre nós: a origem e história desse vírus*, Departamento de microbiologia – ICB/USP, São Paulo, p. 2 (2020), URL: <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/virologia/h1n1-mais-de-90-anos-entre-nos-a-origem-e-historia-desse-virus/>, acesso em: 12/09/2020.
10. M.L. Cohen, Changing patterns of infectious disease, *Nature*, **406**(6797), 762-767 (2000), DOI: 10.1038/35021206.
11. T.O. Neto, T.S. Leite, E. Spinussi, Pandemia de COVID-19, as fronteiras pelo mundo e o transporte aéreo na Itália, *Revue Franco-Brésilienne de Géographie / Revista Franco-Brasileira de Geografia*, **44**, 1-24 (2020), DOI: 10.4000/con-fins.27577.
12. H.J.d. Matos, La próxima pandemia: ¿estamos preparados? (Editorial), *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, **9**(3), 1-3 (2018), DOI: 10.5123/s2176-62232018000300001.
13. WHO archives, *Disinfectants and antiseptics*, 2020, URL: <http://archives.who.int/eml/wmf/2004/English/Disinfectants%20and%20antiseptics.pdf>, acesso em: 03/11/2020.
14. ScienceDirect [Base de dados – Internet]. Elsevier; 2016. Disponível em: <www.sciencedirect.com> (2020), acesso em: 13/09/2020.
15. D. Pittet, B. Allegranzi, J. Storr, S. Bagheri-Nejad, G. Dziekan, A. Leotsakos, L. Donaldson, Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries, *Journal of Hospital Infection*, **68**(4), 285-292 (2008), DOI: 10.1016/j.jhin.2007.12.013.
16. WHO Guidelines on Hand Hygiene, URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44102/9789241597906_eng.pdf;jsessionid=F19045DE424611C875EEC1A6758F2ED1?sequence=1, acesso em: 27/08/2020.
17. C.M. Quintella, A.M. Tavares da Mata, G.F. Ghesti, P.M.d.A. Lopes-Tavares da Mata, Vacinas para coronavírus (COVID-19); SARS-COV-2): Mapeamento preliminar de artigos, patentes testes clínicos e mercado, *Cadernos de Prospecção – Salvador*, **13**(1), 3-12 (2020), DOI: 10.9771/cp.v13i1.35871.

18. Espacenet, Banco de Dados Mundiais de Patentes - European Patent Office 2016, URL: <https://worldwide.espacenet.com/>, acesso em: 13/07/2020.
19. C. Dantas, Taxa de letalidade do Sars-Cov-2 é maior que a da gripe, mas é a menor da família coronavírus, *G1 – Globo*, pp. 01 web (2020), Disponível em: Taxa de letalidade do Sars-Cov-2 é maior que a da gripe, mas é a menor da família coronavírus; veja comparativos | Coronavírus | G1 (globo.com), acesso em: 12/04/2020.
20. M.S. Kreibich, *Unidade de saúde de Blumenau conta como se mantém sem contaminação interna desde o início do enfrentamento da COVID-19*, Hospital do Pulmão, Blumenau, SC, p. 1 (2020), URL: <https://www.hospitaldopulmao.com.br/blog/unidade-de-saude-de-blumenau-counta-como-se-mantem-sem-contaminacao-interna-desde-o-inicio-do-enfrentamento-da-covid-19>, acesso em: 12/04/2020.
21. C.-C. Lai, T.-Z. Shih, W.-C. Ko, H.-J. Tang, P.-R. Hsueh, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **55**(3), 105924 (2020), DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924.

COMO CITAR ESTE ARTIGO

R. Almeida-Silva, F. Cruz-Gonzaga, G. Moraes de Jesus, Estudo prospectivo tecnológico e científico de antissépticos para prevenir a disseminação de SARS-COV-2 e outros vírus patogênicos, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 650-663 (2021).

Hypoglycemic and Antihyperlipidemic effects of *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels and *Syzygium paniculatum* (Gaertn.)

Renata Junqueira Pereira^{1*}, Maria das Graças Cardoso², Milene Aparecida Andrade², Rodrigo Junqueira Pereira³

¹ Universidade Federal do Tocantins, Departamento de Nutrição, Palmas-TO, Brazil.

² Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Lavras-MG, Brazil.

³ Universidade Federal de Rondonópolis, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Rondonópolis-MT, Brazil.

*Corresponding author: renatajunqueira@uft.edu.br

Received: 24 September 2020

Revised: 20 March 2021

Accepted: 26 March 2021

SUMMARY

Introduction: there is a recent increase in interest in the use of medicinal and phytotherapeutic plants. **Objective:** to verify the effect of ethanolic extracts from different parts of fruits of two species of the genus *Syzygium*, on glucose and lipid levels in the blood, using animal models. **Results:** the bark extract of the seeds of *S. cumini* (Lamarck) Skeels proved to be effective in reducing blood glucose levels. This same extract was also effective in lowering blood cholesterol levels. The extract from the seed nuclei of *S. cumini* (Lamarck) Skeels and *S. paniculatum* (Gaertn) were effective in reducing blood triglyceride levels. Extracts from all parts of the fruits of *S. cumini* (Lamarck) Skeels and of the seed nuclei of *S. paniculatum* (Gaertn) prevented weight gain in the animals. **Conclusion:** in general, the seed extract of both species showed a direct influence on the parameters and characteristics under study.

Keywords: Diabetes, *Syzygium*, Lipids, Blood glucose.

RESUMEN

Efectos hipoglucémicos y antihiperlipidémicos de *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels y *Syzygium paniculatum* (Gaertn.)

Introducción: hay un reciente aumento del interés en el uso de plantas medicinales y fitoterapéuticas. **Objetivo:** verificar el efecto de los extractos etanólicos de diferentes partes de frutos de dos especies del género *Syzygium*, sobre los niveles de glucosa y lípidos en la sangre, utilizando modelos animales. **Resultados:** el extracto de corteza de las semillas de *S. cumini* (Lamarck) Skeels demostró ser eficaz para reducir los niveles de glucosa en la sangre. Este mismo extracto también fue eficaz para reducir los niveles de colesterol en la sangre. El extracto de los núcleos de semillas de *S. cumini* (Lamarck) Skeels y *S. paniculatum* (Gaertn) fueron eficaces para reducir los niveles de triglicéridos en la sangre. Los extractos de todas las partes de los frutos de *S. cumini* (Lamarck) Skeels y de los núcleos de semillas de *S. paniculatum* (Gaertn) impidieron el aumento de peso en los animales. **Conclusión:** en general, el extracto de semillas de ambas especies mostró una influencia directa sobre los parámetros y características en estudio.

Palabras clave: Diabetes, *Syzygium*, lípidos, glucemia.

RESUMO

Efeitos hipoglicemiantes e antihiperlipidêmicos de *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels and *Syzygium paniculatum* Gaertn

Introdução: há um aumento recente do interesse pelo uso de plantas medicinais e fitoterápicas. **Objetivo:** verificar o efeito de extratos etanólicos de diferentes partes de frutos de duas espécies do gênero *Syzygium*, sobre os níveis de glicose e lipídios no sangue, por meio de modelos animais. **Resultados:** o extrato da casca das sementes de *S. cumini* (Lamarck) Skeels mostrou-se eficaz na redução da glicemia. Este mesmo extrato também foi eficaz na redução dos níveis de colesterol no sangue. Os extratos dos núcleos das sementes de *S. cumini* (Lamarck) Skeels e *S. paniculatum* (Gaertn) foram eficazes na redução dos níveis de triglicérides no sangue. Extratos de todas as partes dos frutos de *S. cumini* (Lamarck) Skeels e dos núcleos das sementes de *S. paniculatum* (Gaertn) impediram o ganho de peso nos animais. **Conclusão:** em geral, o extrato de sementes de ambas as espécies apresentou influência direta nos parâmetros e características em estudo.

Palavras-chave: Diabetes, *Syzygium*, lipídeos, glicemia.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus is a heterogeneous syndrome, characterized by a progressive decline of insulin action followed by the inability of β -pancreatic cells to compensate this resistance to insulin. According to the Brazilian Diabetic Society, the number of adults with diabetes mellitus in the world in 2017 was estimated at around 425 million and is expected to rise to 629 million by 2045 [1].

About 79 % of these individuals with diabetes mellitus live in developing countries, where the diabetes mellitus epidemic is more intense and shows a growing proportion of affected people in younger age groups [2].

According to Barreiro *et al.* [3], learning within different ethnic groups resulted in priceless contributions to the development of research in natural products and knowledge of the close relationship between the chemical structure of a certain substance and its biological properties. The World Health Organization has provided incentives for research about the technical-scientific knowledge of medicinal plants due to the increasing number of people currently employing their properties [4].

With the increased interest in using medicinal phytotherapeutic plants, the purpose of this paper was to verify the effect of ethanolic extracts of different parts from the fruits of two species of the *Syzygium* genus on blood glucose and lipid levels and other metabolic alterations typical of diabetes mellitus, using animal models.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Wistar rats, 35 days old, weighing 140 ± 28.07 g, were kept in individual metabolic cages, at controlled temperature (22 ± 2 °C), with dark/light cycles of 12/12 h. All animals were given a standard commercial diet and water *ad libitum* prior to the diabetes induction. The specimens were acquired from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation of the State University of Campinas, Brazil (Cemib/Unicamp). The experiment was carried out in the facilities of the Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras, Brazil. The experimental protocol n° 23101.003106/2013-55 was submitted and approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the Federal University of Tocantins, Brazil.

Administration of the high-lipid diet and diabetes induction

The animals were submitted to the *ad libitum* intake of a semi-purified diet with high lipid contents, based on the guidelines of the American Institute of Nutrition (AIN-93G) [5-7], with modifications. The overall energy component of the diet consisted of 44 % lipids, 15.2 % proteins and 40.8 % carbohydrates.

Composition of the High-Lipid Diet (g100g⁻¹): corn starch 24.0; dextrinized corn starch (90-94 % of tetrassacarides) 13.0; casein (\geq 85 % of protein) 20.0; saccharose 10.0; soybean oil 7.0; pork fat 15.0; cellulose 5.0; mineral pre-mix AIN-93G 3.5; vitamin pre-mix AIN-93 1.0; L-cystine 0.3; DL-methionine 0.16; choline bitartrate 0.25; cholesterol 0.5; sodium cholate 0.2; butylhydroxytoluene 0.01 (BHT); vitamin E 0.01.

The animals were given an intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/Kg) (Sigma-Aldrich), having been offered no food during the previous night (12 h). After this procedure, the animals were initiated in the high-lipid diet. Three days after the streptozotocin injection, the glucose blood levels were measured daily for seven days, using Accu-Check Advantage II (Roche Diagnostics, Germany). Animals with fasting glucose higher or equal to 200 mg/dL were considered diabetic and randomly included in the study groups. The animals were given the high-lipid diet and water *ad libitum* until the end of the experiment.

Collecting the plant material

The plant material was collected in the morning (ambient temperature: 21.6 °C), at the Historical Campus of the Federal University of Lavras (UFLA), in Lavras, Minas Gerais, Brazil and at the São Bento Farm, in Três Corações, Minas Gerais, Brazil. The species *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Syzygium paniculatum* (Gaertn.) were properly identified by Dsc. Marcos Sobral, at the Federal University of São João Del Rei, in São João Del Rei, Minas Gerais, Brazil, and registered in the Herbarium of the UFLA Biology Department at numbers 25 133 and 25 134, respectively. The plant material was processed on the same day. The different parts of the fruits were stored in a ventilated drier with mechanical air circulation (Fanem 320-SE), at 30 °C, for approximately 7 days. After this drying period, the ethanolic extracts were prepared using cold extraction.

Obtaining the extracts

The extraction procedure was carried out at the Laboratory of Organic Chemistry of the Federal University of Lavras, where the different parts of the plants were sorted and dried and then submitted to cold extraction with 98 % ethanol [8]. Extracts were prepared with the seeds, the pulp and the seed skins of each of the two species. The material was submitted to particulation, submerged in 98 % ethanol, stored in Erlenmeyer,

wrapped in aluminum foil and stored at room temperature for 4 days. After this period, the plant material was vacuum filtered using a Buchner funnel. The solvent was evaporated using a rotating evaporator (Büchi R-114) and hot water bath (Büchi B-480), at 50 °C. The extract thus obtained was placed on previously dried and weighed porcelain capsules and left in a non-ventilated drier at 45 °C until a constant weight was obtained. After the total evaporation of the solvent, the capsules were wrapped in a layer of plastic film and another of aluminum foil and left in the fridge, at temperatures between 3 and 4 °C.

Biological assay

Diabetes was induced in the animals according to the methodology proposed by Reeves *et al.* [7] and Srinivasan *et al.* [9], who advocated the use of the high-lipid diet associated to streptozotocin (50 mg/Kg). Each group consisted of 6 animals (n= 42), initially treated with high-lipid diet and streptozotocin, and later distributed randomly among the groups. Group A: diabetic animals, not treated (control); Group B: diabetic animals treated with the alcoholic extract of seed cores of *S. paniculatum* (Gaertn.) (SP seeds); Group C: diabetic animals treated with the alcoholic extract of the pulp of *S. paniculatum* (Gaertn.) (SP pulp); Group D: diabetic animals treated with the alcoholic extract of the seed skins of *S. paniculatum* (Gaertn.) (SP skin); Group E: diabetic animals treated with the alcoholic extract of the seed skins of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (SC skin); Group F: diabetic animals treated with the alcoholic extract of the pulp of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (SC pulp); Group G: diabetic animals treated with the alcoholic extract of seed cores of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (SC seeds).

The doses of the extracts were dissolved in 0.5 mL of drinking water, Ingá brand, coming from the same batch, and the resulting solution was given by gavage once a day for 20 days. A flexible tube with a rounded tip was introduced into the animal's mouth and gently pushed through the esophagus to the stomach. The choice of doses used for each extract was based on the available literature concerning studies of the hypoglycaemic effect of *Syzygium* plant genus and was 200 mg/kg/day for all extracts tested. Food and water intake and urine volume were measured every day. The experiment lasted 21 days. Blood was collected on days 0, 7 and 14, by means of the amputation of the tip of the tail, for the weekly biochemical tests. At the end of the experiment (day 21), euthanasia was done, the animals were put down after anesthesia with sodium thiopental (50 mg/kg) and were put to exsanguination [10]. Blood was collected through cardiac puncture for biochemical testing. The livers and pancreases were sent out for anatomical examination.

Evaluation of the biochemical parameters

The capillary level of fasting glucose was evaluated on a daily basis until the diabetes mellitus was clinically identified. For this proceeding, the fasting glucose was assessed on a weekly basis, using a colorimetric enzymatic test performed with commercial kits (Labtest Diagnóstica-SA). Insulin levels were measured before the beginning and at the end of the treatment period, using an Elisa commercial kit manufactured by Milipore®. Triglyceride levels were measured weekly using a colorimetric test performed with commercial kits (Labtest Diagnóstica-SA). The weekly evaluation of cholesterol levels was carried out with colorimetric enzymatic test kits (Labtest Diagnóstica - SA). Total cholesterol, fractions HDL and LDL+ VLDL were measured.

Histological testing

After the cardiac puncture, the animals were put down and had their abdominal cavity opened to expose the internal organs. Fragments of pancreas and liver were collected, stored in formaldehyde 10 % and processed by inclusion in paraffin. Sections 5.0 µm thick were colored with hematoxylin-eosin and studied by optical microscopy.

Experimental outline

The design of the experiment was the completely randomized type (CRS), with six repetitions. The treatments were arranged in different groups (A, B, C, D, E, F and G); body weight, water intake, food intake and urinary volume were measured daily, and the biochemical parameters were measured weekly (days 0, 7, 14 and 21).

Statistical Analysis

The data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test. Those that did not present a normal distribution ($p < 0.05$) were transformed in order to obtain normality (square root) and analyzed by parametric statistic tests (Variance Analysis, Student's t-test and paired t-test). Those figures that even after transformation did not reach normal distribution, had their transformations disregarded and were analyzed by means of non-parametric statistic tests (Kruskal-Wallis and Dunn's test). The statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System-SAS, version 9.2 [11].

Results and discussion

Insulin amounts did not differ significantly within the same treatment when compared before and after the experimental period; a significant difference was found only for the control group. As it can be seen, the control group showed a significant increase in insulin amounts before and after the treatment.

Table 1. Average figures for blood insulin and glucose before and after the experiment.

Group	Blood insulin (ng/dL) period		Blood glucose (mg/dL) period	
	Initial	Final	Initial	Final
Control	2.39 ± 0.33*	3.59 ± 0.55*	224.84 ± 137.11	355.82 ± 212.89
SP Seeds	3.85 ± 0.47	3.60 ± 0.32	246.90 ± 126.34	282.38 ± 94.59
SP Pulp	3.55 ± 0.59	3.36 ± 0.50	286.35 ± 103.55	383.33 ± 231.19
SP Skin	3.12 ± 0.21	3.36 ± 0.65	258.74 ± 135.01	398.30 ± 163.77
SC Skin	3.68 ± 0.21	3.71 ± 0.61	292.98 ± 148.77	158.18 ± 61.81
SC Pulp	2.30 ± 0.03	2.30 ± 0.03	403.96 ± 95.04	466.35 ± 151.86
SC Seeds	2.28 ± 0.03	2.30 ± 0.07	481.50 ± 207.85	467.10 ± 132.85

*Differed significantly before and after the experimental period ($p < 0.05$) according to the paired t-test.

The results obtained for blood insulin in this study go against those of the authors who state that *S. cumini* (L.) Skeels has hypoglycemic effects due to an increase in the plasmatic levels of insulin [12-14]. However, they are similar to those of Vikrant *et al.* [15], who observed a preventive effect for the development of hyperinsulinemia in rats fed with fructose, during their study of the ethanolic extracts of *S. cumini* (L.) Skeels.

No significant differences were observed in terms of fasting glycaemia when comparing the control and the treatment groups. Only on the 7th day after treatment the glycaemia of SC Pulp and SC Seeds treatment groups appeared significantly higher ($p < 0.05$) than SP pulp group.

Regarding the amounts for fasting glucose, in the different treatment days within a same group, a statistically significant difference was observed only in SP Pulp group, between the glycaemia after 7 days of treatment and the final glycaemia (21 days). A significant increase in glucose levels was observed at the end of the experimental period. Similarly, other authors also failed to observe an effect of *S. cumini* (L.) Skeels on the reduction of glucose levels in laboratory animals or humans [16-18].

Table 2. Average percentage of fasting glucose, cholesterol and triglycerides reduction/increase in each treatment.

Group	Glycaemia (mg/dL) percentage's increase or reduction	Cholesterol (mg/dL) percentage's increase	Triglyceride (mg/dL) Percentage's reduction
Control	59.56 %	229.46 %	-54.39 %
SP Seeds	46.41 %	122.93 %	-60.81 %

(keep going)

SP Pulp	31.94 %	284.18 %	-28.95 %
SP Skin	89.51 %	24.28 %	-46.43 %
SC Skin	-38.73 %	14.15 %	-15.64 %
SC Pulp	22.39 %	62.15 %	-58.12 %
SC Seeds	17.41 %	12.51 %	-73.28 %

When comparing the differences between the final and initial fasting glucose levels, we observed that all treatment promoted an increase in glycaemia at the end of the experimental period, and that only the SC Skin group saw its glucose levels reduced; its percentage was significantly different from that of the control group.

Groups SP Seed, SP Pulp, SC Seed and SC Pulp showed an increase in the final glucose amounts, yet still inferior to the amounts observed in the control group. This difference was not statistically relevant.

Other studies observed a reduction in glucose levels after the administration of *S. cumini* (L.) Skeels [19-21]. Sharma *et al.* [22], when studying the ethanolic extract of seeds of *S. cumini* (L.) Skeels in rabbits with alloxan-induced diabetes, observed a significant reduction of the fasting glucose, of the hyperglycemic peak in the glucose tolerance test and of the glycosylated hemoglobin.

Our study tested two different parts of the seeds of *S. cumini* (L.) Skeels (skin and core). According to our observations, only the skins of the seeds had any reducing effect on the animals' fasting glucose, an indication that the active principle is probably located in this part of the seed.

The action mechanism of the jambul fruit in the reduction of glucose levels is not yet clear. However, some works attributed the effects of the plant over blood glucose levels to its presumed inhibition of α -glycosidase and α -amilase, key enzymes in the metabolism of carbohydrates responsible for the final degradation of oligosaccharides and disaccharides, ingested as food, into monosaccharides [20, 23-25].

In the SP Seeds group, blood cholesterol levels increased significantly between the period before the treatment and the 14th day of treatment.

The SC Skin group showed a significant increase of blood cholesterol levels between the period before the treatment and the 14th day of treatment, with a further significant reduction observed between the 14th and 21st days of treatment. The blood levels of triglycerides were significantly reduced between the pre-experiment period and the 21st day of treatment for the SP Seeds and SC Seeds groups.

Table 3. Average figures for blood lipids before and after the experiment.

Group	Triglycerides (mg/dL)		Total Cholesterol (mg/dL)	
	Initial	Final	Initial	Final
Control	372.56 ± 97.84	301.12 ± 58.75	182.10 ± 124.23	206.00 ± 84.24
SP Seeds	213.58 ± 110.05*	71.62 ± 21.18*	73.67 ± 19.96	160.93 ± 45.37
SP Pulp	175.43 ± 123.15	101.25 ± 53.19	88.43 ± 51.58	210.43 ± 135.59
SP Skin	229.04 ± 35.61	84.16 ± 52.08	187.68 ± 99.36	221.02 ± 158.60
SC Skin	110.28 ± 88.49	95.68 ± 38.97	139.75 ± 31.21	153.78 ± 53.34
SC Pulp	394.15 ± 84.87	215.04 ± 53.03	158.90 ± 126.56	222.66 ± 131.39
SC Seeds	565.76 ± 61.22●	105.46 ± 54.73●	374.28 ± 321.90	282.34 ± 150.52

Values followed by the symbols (* ●) differed significantly from each other, by the Dunn Test.

In all treatment groups, including the control, blood cholesterol levels increased, and triglycerides dropped when we compare the serum data between the beginning of the treatment and at the end of it.

Considering the diet with high lipid contents offered *ad libitum*, it was expected an increase in the blood amounts of both lipids. The percentages of increase for blood cholesterol did not differ significantly from the control group; neither did it differ between the treatments. As for blood triglycerides serum, it must be pointed out that the percentage of reduction observed for the SC Seeds treatment was the highest, yet it was significantly different only from the SC Skin treatment. When comparing the treatments, we observed that the extract of the parts of the seeds of both species were those that showed a significant influence on the lipemia of the animals. Schoenfelder *et al.* [21], in an experimental study with rats observed hypolipidemic activity in animals with diabetes and improving of the lipid profile.

The action mechanism of these plants in the body remains unknown, but according to literature the effects of *S. cumini* (L.) Skeels on lipemia can be attributed to different factors, such as the presence of hypocholesterolemic compounds which may work as enzymatic inhibitors, inhibiting cholesterol biosynthesis enzymes, or inhibiting the intestinal absorption of cholesterol, or otherwise inhibiting lipid peroxidation. It is also possible that the extract can stimulate insulin production to the point that the activity of the hormone-sensitive lipase is reduced [13, 21].

No significant differences were observed between the treatments regarding the following biochemical parameters: final total cholesterol, final HDL and final LDL+VLDL (Kruskal-Wallis, at 5 % of significance). As can be observed, the levels of cholesterol of the animals from SP Seeds and SC Skin groups did not exceed the

maximum limits of normality, remaining below 200 mg/dL, even while in the high-lipid diet. This behavior was not observed in the control groups or in the other groups.

Table 4. Average weight gain and food intake for the experimental group.

Group	Overall Weight Gain (grams)	Food Intake (g/day)
Control	76.66 ± 17.55	15.36 ± 3.37
SP Seeds	27 ± 13.51**	15.75 ± 3.66
SP Pulp	61 ± 27.70	16.91 ± 1.97
SP Skin	51.66 ± 7.64	16.92 ± 2.30
SC Skin	26 ± 12.45**	15.22 ± 2.34
SC Pulp	30 ± 13.42**	16.00 ± 1.96
SC Seeds	36.66 ± 36.15**	15.74 ± 2.88

** Differed significantly from the control group according to Student's t-test ($p < 0.05$).

As can be observed, the control group showed more weight gain than the other treatment groups. SP Seeds, SC Skin, SC Pulp and SC Seeds groups showed a weight gain significantly lower than the control group. Food and water intake, urine volume and hyperglycaemia levels did not differ significantly among the groups according to the variance analysis. Such evidence is an indication that treatments with the ethanolic extracts of all parts of the fruits of *S. cumini* (L.) Skeels and of the seeds of *S. paniculatum* (Gaertn.) may have had a direct influence on the weight of the animals.

Sharma *et al.* [22] observed regulatory effects of the ethanolic extract of the seeds of *S. cumini* (L.) Skeels on molecules PPAR α and PPAR γ , which control the energy and lipid metabolism and are involved in the control of resistance to insulin, adipocyte differentiation and lipid storage, which may contribute to explaining the smaller weight gain of the animals in this study.

The histological exams showed no alterations suggestive to toxicity in the liver or pancreas tissues analyzed. The livers of all analyzed groups, including the control group, showed areas of hepatic steatosis, an effect that was attributed to the high-lipid diet. No areas of necrosis were observed. None of the animals in the treated groups died.

Sridhar *et al.* [14], when administering ethanol seeds of *S. cumini* (L.) Skeels to diabetic animals, in the form of powder, did not report any abnormality or mortality, therefore suggesting that this plant has low toxicity. Sharma *et al.* [22], when administering the ethanolic extract of seeds of *S. cumini* (L.) Skeels to laboratory animals, in the same dose used in this study, did not observe any modification of the biochemical parameters suggestive to toxicity.

Overall, the seed extracts from both species were those that showed a direct influence on the parameters and characteristics under study.

It is known that plant chemical substances may vary according to factors such as humidity, sun exposure and climate conditions. The failure to observe some metabolic effects in this study does not rule out the possibility that these effects may be obtained with plants collected in another period of the year or in different geographical locations.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020*, Clannad Editora Científica, São Paulo, 2019.
2. International Diabetes Federation, *IDF Atlas*, 8.º ed., International Diabetes Federation, Bruxelas, 2017.
3. C.B. Meinerz, History teaching, intercultural dialogue and ethnic-racial relations, *Educação & Realidade*, **42**(1), 59-77 (2017).
4. The World Health Organization, *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneve, 2013.
5. P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C.J. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *The Journal of Nutrition*, **123**, 1939-1951 (1993).
6. P.G. Reeves, K.L. Rossow, J. Lindlauf, Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice, *The Journal of Nutrition*, **123**, 1923-1931 (1993).
7. P.G. Reeves, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet, *The Journal of Nutrition*, **127**, 838-841 (1997).
8. C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2007.

9. K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat, C.L. Kaul, P. Ramarao, Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening, *Pharmacological Research*, **52**, 313-320 (2005).
10. B. Close, Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2, *Laboratory Animals*, **31**, 1-32 (1997).
11. SAS Institute Inc., *SAS/STAT® 9.4 User's Guide*, SAS Institute Inc., Cary (NC), 2016.
12. S. I. Rizvi, N. Mishra, Traditional Indian medicines used for the management of diabetes mellitus, *Journal of Diabetes Research*, **2013**, 2013 (2013).
13. B. Sharma, C. Balomajumder, P. Roy, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2376-2383 (2008).
14. S.B. Sridhar, U.D. Sheetal, M.R.S.M. Pai, M.S. Shastri, Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**, 463-468 (2005).
15. V. Vikrant, J.K. Grover, N. Tandon, S.S. Rathi, N. Gupta, Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycaemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **76**, 139-143 (2001).
16. D.C. Damasceno, P.H.O. Lima, M.S. Galhiane, G.T. Volpato, M.V.C. Rudge, Avaliação do efeito hipoglicemiante da sapogenina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam., *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **4**, 46-54 (2002).
17. M.T. Pepato, D.M. Mori, A.M. Baviera, J.B. Harami, R.C. Vendramini, I.L. Brunetti, Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, **96**, 43-48 (2005).
18. C.C. Teixeira, F.D. Fuchs, L.S. Weinert, J. Esteves, The efficacy of folk medicines in the management of type 2 diabetes mellitus: results of a randomized controlled trial of *Syzygium cumini* (L.) Skeels, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **31**(1), 1-5 (2006).
19. M. Ayyanar, P. Subash-Babu, S. Ignacimuthu, *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidence, *Complementary Therapies in Medicine*, **21**, 232-243 (2013).

20. M.S. Baliga, S. Fernandes, K.R. Thilakchand, P. d'Souza, S. Rao, Scientific validation of the antidiabetic effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a traditional medicinal plant of India, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **19**(3), 191-197 (2013).
21. T. Schoenfelder, C.Z. Warmlin, M.S. Manfredini, L.L. Pavei, J.V. Réus, T.C. Tristão, M.S. Fernandes, L. Costa-Campos, Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae in diabetic rats, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**(2), 222-227 (2010).
22. B. Sharma, C. Balomajumder, P. Roy, Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits, *Journal of Ethnopharmacology*, **5**, 201-206 (2003).
23. T.C. Freitas, C.A. Pereira, L.L.S. Pereira, *Syzygium* sp (Myrtaceae) extracts: Inhibition of alpha amylase, *European Journal of Medicinal Plants*, **4**(1), 116-125 (2014).
24. P.M. Souza, P.M. de Sales, L.A. Simeoni, E.C. Silva, D. Silveira, P.O. Magalhães, Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado, *Planta Medica*, **78**, 393-399 (2012).
25. W.Y. Tong, H. WanG, V.Y. Waisundara, D. Huang, Inhibiting enzymatic starch digestion by hydrolysable tannins isolated from *Eugenia jambolana*, *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 389-395 (2014).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

R. Junqueira-Pereira, M. Graças-Cardoso, M.A. Andrade, R. Junqueira-Pereira, Hypoglycemic and Antihyperlipidemic effects of *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels and *Syzygium paniculatum* (Gaertn.), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 664-676 (2021).

Fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja)

César Joe Valenzuela Huamán*, Lida Velazque Rojas, Carolay Julissa Cordova Villavicencio, Tania de la Flor Cutimpo Paucar

Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Perú.

*Correo electrónico: qf.joes@gmail.com

Recibido: 15 de abril de 2020

Revisado: 21 de marzo de 2021

Aceptado: 26 de marzo de 2021

RESUMEN

Objetivo: elaborar una bebida por fermentación alcohólica y la cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja). **Metodología:** se utilizó el método de fermentación alcohólica por levadura de la variedad *Saccharomyces cerevisiae*, se fermentó el jugo de naranja con una densidad de 1,050 g/cm³ por 5 semanas y se cuantificó los flavonoides de la bebida alcohólica por el método de cromatografía HPLC. **Resultados:** después de las 5 semanas se analizó que la bebida por fermentación alcohólica tuvo un 11 % de alcohol y flavonoides de hesperidina 13,9 mg/100 ml y naringenina 6,3 mg/100 ml en su concentración.

Palabras clave: Flavonoides, hesperidina, naringenina, fermentación alcohólica, naranja.

SUMMARY

Alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and quantification of flavonoids of the *Citrus x clementina* juice (orange)

Aim: to elaborate a drink by alcoholic fermentation and the quantification of flavonoids in *Citrus x clementina* (orange) juice. **Methodology:** the method of alcoholic fermentation by yeast of the *Saccharomyces cerevisiae* variety was used, the orange juice was fermented with a density of 1.050 g/cm³ for 5 weeks and the flavonoids of the alcoholic beverage were quantified by the HPLC chromatography method.

Results: after 5 weeks it was analyzed that the drink by alcoholic fermentation had 11 % alcohol and hesperidin flavonoids 13.9 mg/100 ml and 6.3 mg/100 ml naringenin in its concentration.

Keywords: Flavonoids, hesperidin, naringenin, alcoholic fermentation, orange.

RESUMO

Fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* e quantificação de flavonóides do suco *Citrus x clementina* (laranja)

Objetivo: elaborar uma bebida por fermentação alcoólica e quantificação de flavonóides no suco *Citrus x clementina* (laranja). **Metodologia:** foi utilizado o método de fermentação alcoólica por levedura da variedade *Saccharomyces cerevisiae*, o suco de laranja foi fermentado com densidade de 1,050 g/cm³ por 5 semanas e os flavonóides da bebida alcoólica foram quantificados pelo método de cromatografia HPLC. **Resultados:** após 5 semanas foi analisado que a bebida por fermentação alcoólica continha álcool a 11 % e flavonóides de hesperidina 13,9 mg/100 ml e 6,3 mg/100 ml naringenina em sua concentração.

Palavras-chave: flavonóides, hesperidina, naringenina, fermentação alcoólica, laranja.

INTRODUCCIÓN

Perú ocupa el décimocuarto lugar como productor mundial de cítricos [1] y el cuarto productor en el hemisferio sur [2]. La producción de naranjas en la provincia de La Convención está destinada exclusivamente al mercado. La población del lugar compra estos productos con fines alimenticios.

Las plantas cítricas presentan antioxidantes como los flavonoides y vitamina C presentes en diferentes partes de la naranja, limón, toronja y mandarina. Estos influyen en la acción antiedemagénica y antiinflamatoria y son útiles para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica. Sus propiedades terapéuticas son: antiagregante plaquetario y antiaterogénica, útiles para la prevención y tratamiento de enfermedades aterotrombóticas [3]. Por lo que al consumirlos se obtendría propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes [4]. La *Citrus x clementina* contiene cantidades apreciables de beta-caroteno, responsable del color típico y conocido por sus propiedades antioxidantes; además de

ácidos málico, oxálico, tartárico y cítrico, esta última potencia la acción de la vitamina C. La naranja y especialmente su zumo, ejerce una acción colerética y colagoga. Tomados en ayunas pueden provocar un vaciamiento brusco de la vesícula biliar que se acompaña de molestias leves como náuseas o pesadez abdominal [5].

Los flavonoides son la clase predominante, ocupando aproximadamente dos tercios de los fenoles dietéticos, estos son un tipo particular de polifenoles presentes en plantas y son los compuestos responsables del color de las flores y frutas [6, 7]. Las dosis normales de ingesta de flavonoides pueden ser de 20-26 mg/día contenidos en frutas y verduras (manzanas, naranjas, guayabas, uvas) [8].

En este contexto el producto “Vino espumante de naranja” podría no solo ser una alternativa biotecnológica novedosa sino también una opción para diversificar la oferta de productos derivados de frutas cítricas, capaz de aumentar las rentas y retenerlas en el ámbito de la economía local [9], así también, podemos pensar en la elaboración fermentos alcohólicos a base de frutas cítricas, como ya se viene utilizando en otras regiones.

El objetivo del presente trabajo fue obtener la fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* por un periodo de 5 semanas y cuantificar los flavonoides del zumo de naranja (*Citrus x clementina*) ya fermentados, para lo cual se utilizó el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector (UV-vis) [10, 11].

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el inicio de la fermentación, se ajustó el jugo de naranja a los valores reportados para la fermentación de uva, que corresponde a 9 g/kg de ácido cítrico. Se realizó el balance de masa de acuerdo a los sólidos solubles total y acidez total para el ajuste del mosto de fermentación. Se cuantificó acidez y pH [12, 13]. El mosto para fermentar se depositó en biorreactor de plástico con capacidad de 10 L. El proceso se extendió por un periodo de 5 semanas, realizando seguimiento de parámetros, azúcares, acidez y pH.

Se realizó un análisis, tomando aproximadamente 150 mL, para el determinar la concentración de azúcar, acides y pH de la bebida fermentada, después de 5 semanas. Se obtuvieron 6 L de zumo de naranja que fueron introducidas en el biorreactor para la fermentación alcohólica, proveniente de la provincia de la Convención, de la variedad *Citrus x clementina*. La transformación de la materia prima se llevó a cabo en el laboratorio de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, siguiendo parámetros de limpieza, desinfección y aplicación de buenas prácticas de manufactura (BPM).

Al biorreactor con los 6 L de zumo de *Citrus x clementina* se adicionó *Saccharomyces cerevisiae* de la variedad *Bayunas*, para la fermentación alcohólica [14, 15]. Seguidamente se adicionó metabisulfito para eliminar las bacterias y como preservante [16, 17], el mosto permaneció en el biorreactor por 5 semanas y una muestra de 20 mL de este fermento alcohólico se llevó al Laboratorio de Control de Calidad de la UNSAAC, para la determinación de flavonoides mediante la cromatografía HPLC y espectrofotometría de masas. Este trabajo de investigación es un diseño descriptivo, debido a que las características de los fenómenos de objeto de estudio se describieron.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del rendimiento de la fermentación alcohólica

El porcentaje de obtención de la fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* del zumo de *Citrus x clementina* de extracción se da por la ecuación 1.

$$\%Rendimiento = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

Rendimiento real: 3870 mL (después de la fermentación alcohólica).

Rendimiento teórico: 6000 mL (6 L de zumo de *Citrus x clementina*).

Análisis

Haciendo cálculos matemáticos se obtuvo que el rendimiento fue 64,5 % mL, sin embargo, según Invinic [18], que se necesita aproximadamente 1.5 KG de uva para obtener una botella de litro de vino, si tenemos en consideración estos resultados el porcentaje de rendimiento que se obtendría sería de 66,66 % de rendimiento que es similar al obtenido en el presente trabajo de investigación.

Según Di Giacomo [19], para obtener una botella de vino de 750 mL se necesita 1 Kg de uva haciendo los cálculos respectivos el porcentaje de rendimiento sería el 75 % y para obtener una botella de fermentación de naranja se necesita 1,2 L de zumo de naranja dando un porcentaje de rendimiento de 64,5 %, por lo tanto, estos valores son ligeramente similares, siendo la obtención de vino la de mayor rendimiento.

Así, Méndez [20] indicó que el porcentaje de rendimiento en la elaboración de vino de naranja es de 70 %, estos datos están más próximos al rendimiento de fermentación alcohólica en el trabajo de investigación realizado.

Es importante entender que la diferencia de porcentajes de rendimiento podría deberse a que la industria enológica utiliza grandes cantidades en la producción, donde las pérdidas en los análisis de acidez y concentración de alcohol son mínimas en comparación al proyecto de fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* del zumo de *Citrus x clementina*.

De la cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja) fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*

La cuantificación de flavonoides en la fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* del zumo de *Citrus x clementina* fue determinada en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco donde se utilizaron la cromatografía y espectrofotometría en la determinación de flavonoides, los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de cuantificación de flavonoides.

Flavonoides	Muestra 1	Muestra 2	muestra 3	Total, mg/100 mL
Hesperidina	14,5	13,6	13,5	13,9
Naringenina total	6,5	6,3	6,2	6,2

Fuente: Laboratorio de cromatografía y espectrofotometría UNSAAC.

Análisis

Las muestras se realizaron por triplicado y cuantificados por HPLC, los resultados de los flavonoides fueron: hesperidina 13,9 mg/100 mL y naringenina 6,2 mg/100 mL, datos encontrados en la variedad *Citrus x clementina*.

En el estudios realizado por Rojas [10] se obtuvo como resultados cítricos como naranja Valencia Campbell con contenidos de naringenina 3,40 µg/mL y hesperidina 44,89 µg/mL, datos menores al presente estudio.

La diferencia que existe entre ambos cítricos podría deberse a la variedad, el estudiado es un injerto entre naranja y mandarina y el de datos bibliográficos es naranja, no se existe mucha bibliografía sobre la concentración de estos flavonoides en zumos de cítricos.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que se obtuvo una bebida por fermentación alcohólica del zumo de *Citrus x clementina* (naranja) con 11 % de alcohol. Los resultados más consistentes obtenidos fueron la concentración de los flavonoides de hesperidina 13,9

mg/100 mL y naringenina 6.2 mg/100 mL del fermento alcohólico de *Citrus x clementina* (naranja).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. R. Larico, *Compatibilidad de patrones y yemas en injerto de cítricos en Echarati-La Convención- Cusco*, tesis de grado, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco, 2015, p. 1-2.
2. Agencia Peruana de Noticias, *Perú es el cuarto productor de cítricos en hemisferio sur*, URL: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/peru-es-el-cuarto-productor-de-citricos-en-hemisferio-sur>, consultado en abril de 2020.
3. M. García, D.M. Armenteros, Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares, *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat*, **3**(2), 39-46 (2002).
4. C.I. Escamilla, E.Y. Cuevas, J. Guevara, Flavonoides y sus acciones antioxidantes, *Revista de la Facultad de Medicina de la Unam*, **52**(2), 73-75 (2009).
5. Fundación Eroski Consumer, *Guía práctica de frutas*, URL: <https://frutas.consumer.es/naranja/propiedades>, consultado abril del 2020.
6. J.M. Peñarrieta, L. Tejada, P. Mollinedo, J.L. Vila, J.A. Bravo, Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos, *Revista Boliviana de Química*, **31**(2), 68-81 (2014).
7. A.M. Viñas, *Polifenoles totales y flavonoides en diferentes extractos de harinas industriales, a granel y artesanales de quinua (Chenopodium quinoa), kiwicha (Amarantus caudatus) y kañiwa (Chenopodium pallidicaule)*, tesis de grado, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú, 2017, p. 3-4.
8. M. Coronado, S. Vega y León, R. Gutiérrez, M. Vázquez, C. Radilla, Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana, *Revista Chilena de Nutrición*, **42**(2), 206-212 (2015).
9. A.S. Leal, *Desarrollo de vino espumante de naranja (var. Valencia) Estudio de su fracción aromática libre y caracterización sensorial con consumidores*, tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, 2015, p. 22.

10. P. Rojas, Determinación por HPLC de flavanonas en jugos cítricos de variedades cultivadas en Santander, *Scientia et Technica*, **13**(33), 293-294 (2007).
11. S. López, *Naringina y sus efectos a nivel densitométrico sobre la regeneración guiada con extracto de uva y colágeno de origen porcino. Estudio en modelo experimental con conejos albinos de Nueva Zelanda*, tesis doctoral, Universidad de Murcia, Murcia, España, 2015, p. 45.
12. J.L. Hoyos, F.E. Urbano, H.S. Villada, S.A. Mosquera, D.P. Navia, Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*Citrus Sinensis*), *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **8**(1), 26-34 (2010).
13. M.M. Ferreyra, M.C. Schwab, L.M. Gerard, L.M. Zapata, C.V. Davies, R.A. Hours, Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, **20**(39), 143-158 (2009).
14. F. Carretero, *Innovación tecnológica en la industria de bebidas*, tesis de grado, Escola Universita d'enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona, Barcelona, España, 2006, p. 4-10.
15. M. Mercedes, *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas*, tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, 2006, p. 173.
16. A. García, *Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación*, tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España, 2012, p. 27.
17. F. Juárez, *Optimización de parámetros para la producción y envasado de chicha de Schinus molle, "molle"*, tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Ayacucho, Ayacucho, Perú, 2011, p. 39.
18. Invinic, ¿Cuántas uvas hacen falta para elaborar una botella de vino?, URL: <https://blog.invinic.com/cuantas-uvas-hacen-falta-para-elaborar-una-botella-de-vino>, consultado en abril de 2020.
19. D. Di Giacomo, ¿Con cuántas uvas se hace un vino?, ¿tiene fecha de vencimiento?, URL: <https://www.devinosyvides.com.ar/nota/256-con-cuantas-uvas-se-hace-un-vino-tiene-fecha-de-vencimiento-y-otros>, consultado en abril de 2020.

20. M.J. Víctor, *Evaluación de la estabilidad del vino de naranja (Citrus sinensis) usando un agente y una enzima clarificante*, tesis de grado, Universidad de Zamorano, Honduras, 2006, p. 10.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

C.J. Valenzuela-Huamán, L. Velazque-Rojas, C.J. Cordova-Villavicencio, T.d.l.F. Cutimpo-Paucar, Fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 677-684 (2021).

Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) act against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*

Laísa Vilar Cordeiro^{1*}, Helivaldo Diógenes da Silva Souza², Giulian César da Silva Sá³, Aleson Pereira Sousa¹, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo¹, Maria das Neves Silva Neta¹, José Maria Barbosa Filho¹, Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹ Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Brazil.

² Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil.

³ Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

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

Received: February 2, 2021

Corrected: March 21, 2021

Accepted: March 29, 2021

SUMMARY

Introduction: biofilm-related infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* are difficult to treat and few effective pharmacological options are currently available for this purpose. In this context, coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) has been reported to have antibacterial and antibiofilm activity, but this potential remains poorly understood. **Aim:** to investigate the action of coumarin on planktonic and biofilm forms of *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. **Results:** a minimum inhibitory concentration (MIC) of coumarin ranging from 256 to 1024 µg/mL was observed, with a remarkable ability to inhibit the formation of biofilms and to act on mature biofilms in concentrations close to MIC. **Conclusion:** coumarin has strong activity against planktonic and biofilm forms on the three species of great relevance in the clinical scenario. These results are interesting to enable a pharmacological alternative for the treatment of these infections.

Keywords: Coumarin, antibacterial activity, biofilms, 2H-1-Benzopyran-2-one.

RESUMEN

La cumarina (2H-1-Benzopiran-2-ona) actúa contra las formas planctónicas y de biopelícula de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*

Introducción: las infecciones relacionadas con la biopelícula causadas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* son difíciles de tratar y actualmente existen pocas opciones farmacológicas eficaces para este propósito. En este contexto, se ha informado que la cumarina (2H-1-Benzopiran-2-ona) tiene actividad antibacteriana y antibiofilm, pero este potencial sigue siendo poco conocido. **Objetivo:** investigar la acción de la cumarina sobre formas planctónicas y de biopelículas de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. **Resultados:** se observó una concentración inhibitoria mínima (CMI) de cumarina en el rango de 256 a 1024 µg/mL, con una notable capacidad para inhibir la formación de biofilms y actuar sobre biofilms maduros en concentraciones cercanas a la CMI. **Conclusión:** la cumarina tiene una fuerte actividad contra las formas planctónicas y biofilm sobre las tres especies de gran relevancia en el escenario clínico. Estos resultados son interesantes para habilitar una alternativa farmacológica para el tratamiento de estas infecciones.

Palabras clave: Cumarina, actividad antibacteriana, biopelículas, 2H-1-Benzopiran-2-ona.

RESUMO

A cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona) age contra as formas planctônicas e de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*

Introdução: as infecções relacionadas ao biofilme causadas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são difíceis de tratar e poucas opções farmacológicas eficazes estão disponíveis atualmente para esse propósito. Nesse contexto, foi relatado que a cumarina (2H-1-benzopirano-2-ona) tem atividade antibacteriana e antibiofilme, mas esse potencial permanece pouco conhecido. **Objetivo:** investigar a ação da cumarina sobre as formas planctônicas e de biofilme de *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. **Resultados:** observou-se uma concentração inibitória mínima (CIM) de cumarina variando de 256 a 1024 µg/mL, com notável capacidade de inibir a formação de biofilmes e de atuar sobre biofilmes maduros em concentrações próximas à CIM. **Conclusão:** a cumarina possui forte

atividade contra as formas planctônicas e de biofilme sobre as três espécies de grande relevância no cenário clínico. Esses resultados são interessantes para possibilitar uma alternativa farmacológica para o tratamento dessas infecções.

Palavras-chave: Cumarina, atividade antibacteriana, biofilmes, 2H-1-benzopirano-2-ona.

INTRODUCTION

Bacteria exhibit two modes of growth. Those that live free in a liquid medium, where they are dispersed, are called planktonic bacteria. When these planktonic bacteria are attached to a surface, they are called sessile cells. In the sessile state, these bacteria differ from their planktonic condition, because living in structured communities they begin to acquire some survival advantages [1]. Bacterial biofilms are formed when planktonic cells adhere to an inert surface and undergo several changes that culminate in the formation of an aggregate complex composed of sessile cells wrapped in an exopolymeric matrix. These complex structures are extremely resistant to the action of the immune system and antibiotics, being closely related to persistent infections. The most important biofilm-forming bacteria include *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, leading to severe clinical complications often with lethal outcomes [2, 3].

Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one, figure 1) is a natural product found in several plant species, which is related to a wide range of biological activities [4]. Among the applicabilities of coumarin, its antibacterial and antibiofilm potential has been shown [5-8], although its action is not completely clear. Based on the need for new therapeutic alternatives to treat infections caused by species producing biofilms, this study aimed to investigate the action of coumarin on planktonic and biofilm forms of *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

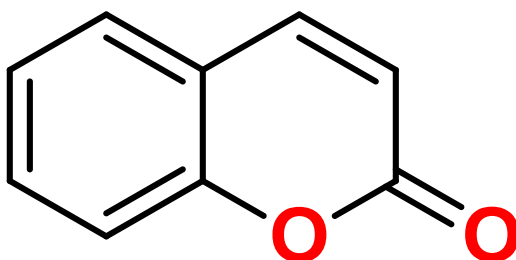


Figure 1. Structure of 2H-1-benzopyran-2-one.

EXPERIMENTAL

Substances

The Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) was obtained from Merck/Sigma-Aldrich[®] (Purity \geq 98 %). The substance was properly weighed and solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5 % and Tween-80 at 2 %, to obtain emulsions in the concentrations necessary for use in the tests.

Strains

In this study, 15 bacterial strains were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC-13150, LM-116, LM-182, LM-297, LM-356), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-700603, LM-143, LM-166, LM-176, LM-260), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-15442, LM-163, LM-230, LM-286, LM-362). Except for the American Type Culture Collection strains (ATCC-13150, ATCC-700603, ATCC-15442), all other strains come from clinical isolates, which are part of the MICOTECA of the Laboratory for Research on Antibacterial and Antifungal Activities at the Federal University of Paraíba, Brazil. For use in the assays, bacterial suspensions were prepared in 0.9 % saline, from fresh cultures, and adjusted to the McFarland standard 0.5 scale.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Coumarin activity on planktonic cells was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) of the substance on the different strains. The analysis was carried out using the broth microdilution technique in a 96-well plate to obtain different concentrations of the substances [9]. (CLSI 2015). Initially, 100 μ L of double strength Brain Heart Infusion (BHI) broth (Sigma-Aldrich/ Merck[®]) was added to the wells, and 100 μ L of the substance emulsion was subsequently added. Serial microdilutions were performed in which a 100 μ L aliquot from a well containing more concentrated medium was transferred to the next well with less concentrated medium, producing final coumarin concentrations ranging from 2048 to 4 μ g/mL. Finally, 10 μ L of bacterial inoculum was added to the wells such that each column contained a different strain. At the same time, sterility, cell viability and interference controls of vehicles used in the preparation of emulsions of substances (DMSO and Tween-80) were also performed. The test was performed in triplicate.

MIC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of bacterial growth after 24 h at 35 ± 2 °C. The antibacterial activity of coumarin was interpreted and considered as active or inactive, according to the criteria already described in the scientific literature: up to 600 μ g/mL, the substance is considered to have

high activity, between 600 and 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with moderate activity; and MIC above 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ characterizes the product with low activity or inactive against the tested strains [10, 11].

Effect of coumarin on bacterial biofilms

The evaluation of coumarin activity on biofilm forms was performed using *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* strains. First, the potential of coumarin to inhibit biofilm formation was verified. For this, the microdilution plates were incubated statically with Brain Heart Infusion (BHI) broth containing different concentrations of coumarin in the presence of the bacterial inoculum (final concentration of 10^7 CFU/mL). Negative controls were carried out containing only culture broth and inoculum. After 24 h of incubation at 35 ± 2 °C, the contents of the wells were discarded and washed three times with sterile distilled water, to remove planktonic cells, reserving them for drying at room temperature. After drying, the 1 % violet crystal solutions were transferred and left to stand for 40 min. The dye was discarded and its excess on the well walls was removed by washing with distilled water. Thus, the wells received absolute ethanol and, after 30 min at rest, the plate was read in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO[®]/ Waltham, Massachusetts, EUA) at 590 nm [12]. All analyzes were performed in quintuplicate.

Then, coumarin action on mature biofilms was verified. That is, the action on preformed biofilms. The plates were previously incubated with BHI broth and inoculum (final concentration 10^7 CFU/mL) for 24 h at 35 ± 2 °C, to form the biofilms in the wells. Then, the contents of the wells were removed and a new culture broth containing different concentrations of coumarin was added. The plates were incubated statically under the same conditions of time and temperature. Finally, the same process described above was performed for evaluation on a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO[®]/ Waltham, Massachusetts, EUA) [13].

Statistical significance was determined by the paired test using the t test and the results were considered statistically significant when $p < 0.05$ for rejection of the null hypothesis. For this plot, the GraphPad Prism software (version 6.0 for Windows, San DIEGO, CA-USA) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Coumarin activity on planktonic cells was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC range obtained was 256 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (table 1).

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of 2H-1-Benzopyran-2-one against bacterial strains.

Strains	2H-1-Benzopyran-2-one	Controls	
	MIC	Microorganism	Culture broth
<i>S. aureus</i>			
ATCC-13150	512 µg/mL	+	-
LM-116	1024 µg/mL	+	-
LM-182	1024 µg/mL	+	-
LM-297	512 µg/mL	+	-
LM-356	512 µg/mL	+	-
<i>K. pneumoniae</i>			
ATCC-700603	256 µg/mL	+	-
LM-143	512 µg/mL	+	-
LM-166	256 µg/mL	+	-
LM-176	256 µg/mL	+	-
LM-260	512 µg/mL		
<i>P. aeruginosa</i>			
ATCC-15442	512 µg/mL	+	-
LM-163	512 µg/mL		
LM-230	256 µg/mL	+	-
LM-286	512 µg/mL	+	-
LM-362	256 µg/mL	+	-

(+): bacterial growth; (-): absence of bacterial growth.

The MIC₅₀ of coumarin was 512 µg/mL on the bacterial species used in this study, indicating moderate antibacterial activity, according to the classification criteria for substances of natural origin [10]. These values corroborate with other authors. Smyth *et al.* 2009 and Souza *et al.* 2005 observed coumarin action, with MIC ranging from 500 to 1000 µg/mL and better activity on Gram-negative strains, as well as what was identified in the present study (table 1). It is suggested that the antibacterial activity of coumarins and their synthetic derivatives is due to the inhibition of DNA gyrase preventing supercoiling, in addition to possibly also acting as photosensitizers for thymine dimers [14]. However, these mechanisms are not fully understood.

When evaluating the activity of coumarin on biofilm forms, a strong activity was noted in inhibiting the formation of biofilms by the three bacterial species studied (Figure 2A-C). The average biofilm inhibition was 89 % in MIC, 91 % and 93 % in 2x MIC and 4x MIC, respectively. Even at subinhibitory concentrations, coumarin was still able to significantly reduce the biofilm formation.

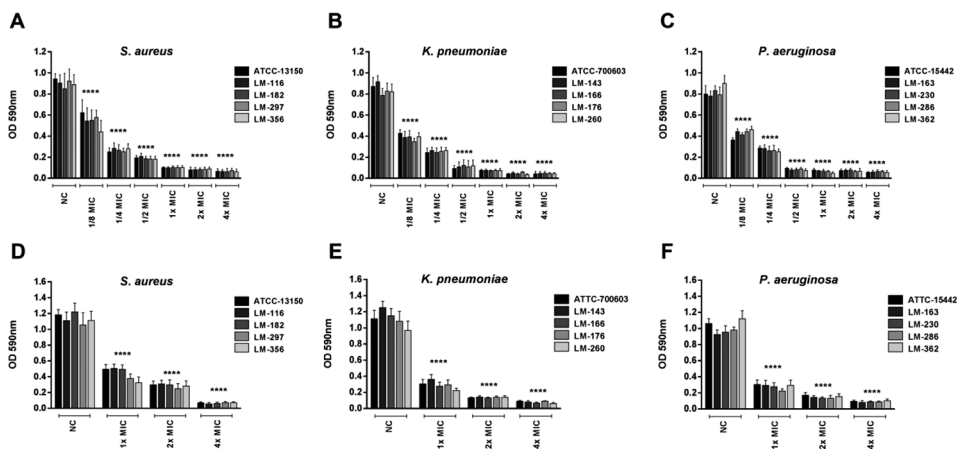


Figure 2. Effect of coumarin on biofilm forms. Inhibition of biofilm formation: **A.** *S. aureus*. **B.** *K. pneumoniae*. **C.** *P. aeruginosa*. Action on mature biofilms formed by **D.** *S. aureus*. **E.** *K. pneumoniae*. **F.** *P. aeruginosa*. Statistical analysis compared to the negative control (NC): **** $p \leq 0.0001$.

Biofilms are much more resistant to antibiotics and can tolerate concentrations 10 to 1000 higher than their respective planktonic forms. Several conventional antibacterial drugs are ineffective against biofilms, even in high concentrations [2]. Another major problem is that some drugs induce an increase in the formation of biofilms when they are in subinhibitory concentrations. During the infection treatment, part of the microorganism's population is exposed to suboptimal concentrations and low doses of these drugs can complicate these diseases [3]. Coumarin did not increase biofilm formation under these conditions, which makes it an interesting molecule to be investigated for this purpose.

Observing coumarin effect on mature biofilms, which, once established, are difficult to remove, there is a significant capacity to act on them, mainly in 4 x MIC (figure 2D-F), where there is an average reduction of 94 % compared to negative controls.

Lee *et al.* [7] and Zhang *et al.* [8] identified coumarin's strong potential to reduce *E. coli* and *P. aeruginosa* biofilms, respectively, also affecting other virulence factors, although the mechanism by which this occurs is not yet fully understood. In addition, other stu-

dies demonstrate that structural modifications based on the chemical skeleton of coumarin result in a great improvement in activity against planktonic and biofilm forms [15, 16].

CONCLUSION

Based on this, it is concluded that coumarin has strong activity against planktonic and biofilm forms on the three species of great relevance in the clinical scenario. It is interesting that more studies investigate this potential of this natural product, to enable a pharmacological alternative for the treatment of these infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

CONFLICT OF INTERESTS

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

1. K.P. Rumbaugh, K. Sauer, Biofilm dispersion, *Nature Reviews Microbiology*, **18**, 571-586 (2020).
2. S. Srivastava, A. Bhargava, Biofilms and human health, *Biotechnology Letters*, **38**(1), 1-22 (2016).
3. M.R.M. Ranieri, C.B. Whitchurch, L.L. Burrows, Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials, *Current Opinion in Microbiology*, **45**, 164-169 (2018).
4. A. Stefanachi, F. Leonetti, L. Pisani, M. Catto, A. Carotti, Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds, *Molecules*, **23**(2), 250 (2018).

5. T. Smyth, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**(5), 421-426 (2009).
6. S.M. Souza, F. Monache, A. Smânia, Antibacterial activity of coumarins, *Zeitschrift für Naturforschung C*, **60**(9-10), 693-700 (2005).
7. J.-H. Lee, Y.-G. Kim, H.S. Cho, S.Y. Ryu, M.H. Cho, J. Lee, Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7, *Phytomedicine*, **21**(8-9), 1037-1042 (2014).
8. Y. Zhang, A. Sass, H. V. Acker, J. Wille, B. Verhasselt, F.V. Nieuwerburgh, V. Kae-ver, A. Crabbé, T. Coenye, Coumarin reduces virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by affecting quorum sensing, type III secretion and c-di-GMP levels, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1952 (2018).
9. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10*, 2015.
10. A. Sartoratto, M.L.A. Machado, C. Delarmelina, M.G. Figueira, T.C.M. Duarte, G.L.V. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 275-280 (2004).
11. P.J. Houghton, M.J. Howes, C.C. Lee, G. Steventon, Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant, *Journal of Ethnopharmacology*, **110**(3), 391-400 (2007).
12. D. Balasubramanian, L. Schneper, M. Merighi, R. Smith, G. Narasimhan, S. Lory, K. Mathee, The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes, *PLoS One*, **7**(3), e34067 (2012).
13. S.K. Rajasekharan, S. Ramesh, A.S. Satish, J. Lee, Antibiofilm and anti- β -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(3), 542-551 (2017).
14. S. Garg, J. Gupta, S. Sharma, D. Sahu, An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **152**, 105424 (2020).

15. M. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, C. Fuentes-Edfuf, Y. Santos, A. Munoz-Crego, Looking for new targets: simple coumarins as antibacterial agentes, *Medicinal Chemistry*, **8**(6), 1140-1145 (2012).
16. T. Das, M.C. Das, A. Das, S. Bhowmik, P. Sandhu, Y. Akhter, S. Bhattacharjee, Modulation of *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilm: an in vitro study with new coumarin derivatives, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **34**(11), 170 (2018).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

L. Vilar-Cordeiro, H.D. da Silva-Souza, G.C. da Silva-Sá, A. Pereira-Sousa, P.T. Ramalho de Figueiredo, M.d.N. Silva-Neta, J.M. Barbosa Filho, E. de Oliveira-Lima, Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) act against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 685-694 (2021).

In silico and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates

Romulo Pereira de Moura Sousa¹, Daniele de Figuerêdo Silva¹, Neuza Maria Cavalcante Oliveira¹, Zélia Braz Vieira Da Silva Pontes¹, Hermes Diniz Neto¹, Laísa Vilar Cordeiro^{1*}, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo¹, Rafael Farias de Oliveira², Helivaldo Diógenes da Silva Souza², Petrônio Filgueiras de Athayde Filho², Edeltrudes de Oliveira Lima¹

¹Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

²Laboratory of Chemistry, Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

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

Received: September 30, 2020

Corrected: March 24, 2021

Accepted: March 29, 2021

SUMMARY

Introduction: invasive candidiasis is related to high rates of morbidity and mortality. There are few classes of drugs available for the treatment of this type of infection and the index of resistant strains is increasing. Such circumstances highlight that the search for new pharmacotherapeutic alternatives is increasingly necessary. This study investigated 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, a substance whose antifungal activity has not yet been reported. **Objective:** to evaluate its activity against invasive candidiasis isolates, by determining the minimum inhibitory and fungicide concentrations. **Methodology:** molecular docking was performed to investigate the possible mechanism of action of the substance. The substance was also associated with fluconazole, to assess the viability of the combination in clinical practice. The minimum inhibitory concentrations ranged between 4 to 32 µg/mL, and it acts in a fungicidal way. **Results:** molecular docking suggests that 2-Bromo-*N*-phenylacetamide possibly acts on the fungal plasma membrane. And the association of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide with fluconazole against resistant strains showed an indifferent effect. **Conclusion:** further studies should be carried out to elucidate the potential of this substance, which may become a future drug candidate to treat invasive candidiasis and other fungal infections.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, antifungal.

RESUMEN

Análisis *in silico* e *in vitro* de una nueva sustancia antifúngica potencial, 2-Bromo-*N*-fenilacetamida, contra cepas de candidiasis invasive

Introducción: la candidiasis invasiva está relacionada con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Hay pocas clases de medicamentos disponibles para el tratamiento de este tipo de infección y el índice de cepas resistentes está aumentando. Tales circunstancias ponen de relieve que la búsqueda de nuevas alternativas farmacoterapéuticas es cada vez más necesaria. Este estudio investigó la 2-Bromo-*N*-fenilacetamida, una sustancia cuya actividad antifúngica aún no se ha informado. **Objetivo:** evaluar su actividad frente a aislados de candidiasis invasiva, mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y fungicidas. **Metodología:** se realizó un acoplamiento molecular para investigar el posible mecanismo de acción de la sustancia. La sustancia también se asoció con fluconazol, para evaluar la viabilidad de la combinación en la práctica clínica. Las concentraciones mínimas inhibitorias oscilaron entre 4 a 32 µg/mL y actúa de forma fungicida. **Resultados:** el acoplamiento molecular sugiere que la 2-Bromo-*N*-fenilacetamida posiblemente actúa sobre la membrana plasmática de los hongos. Y la asociación de 2-Bromo-*N*-fenilacetamida con fluconazol contra cepas resistentes mostró un efecto indiferente. **Conclusión:** deben realizarse más estudios para dilucidar el potencial de esta sustancia, que puede convertirse en un futuro candidato a fármaco para tratar la candidiasis invasiva y otras infecciones fúngicas.

Palabras clave: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, 2-Bromo-*N*-fenilacetamida, antifúngico.

RESUMO

Análise *in silico* e *in vitro* de uma nova substância antifúngica potencial, 2-Bromo-*N*-fenilacetamida, contra isolados de candidíase invasiva

Introdução: a candidíase invasiva está relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Existem poucas classes de medicamentos disponíveis para o tratamento desse tipo de infecção e o índice de cepas resistentes está aumentando. Tais circunstâncias

evidenciam que a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas é cada vez mais necessária. Este estudo investigou a 2-Bromo-N-fenilacetamida, uma substância cuja atividade antifúngica ainda não foi relatada. **Objetivo:** avaliar sua atividade contra isolados de candidíase invasiva, por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias e fungicidas. **Metodologia:** o docking molecular foi realizado para investigar o possível mecanismo de ação da substância. A substância também foi associada ao fluconazol, para avaliar a viabilidade da associação na prática clínica. As concentrações inibitórias mínimas variaram entre 4 a 32 µg/ML e atuam de forma fungicida. **Resultados:** o docking molecular sugere que a 2-Bromo-N-fenilacetamida possivelmente atua na membrana plasmática do fungo. E a associação de 2-Bromo-N-fenilacetamida com fluconazol contra cepas resistentes mostrou efeito indiferente. **Conclusão:** Novos estudos devem ser realizados para elucidar o potencial dessa substância, que pode se tornar uma futura droga candidata ao tratamento de candidíase invasiva e outras infecções fúngicas.

Palavras chave: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, 2-Bromo-N-fenilacetamida, antifúngico.

INTRODUCTION

Invasive candidiasis is the most frequent invasive fungal infection. Despite advances in the care of critically ill patients, invasive candidiasis still promotes prolonged hospitalization, with a gross mortality rate of around 50 %, which signals the need to improve clinical practices, including early diagnosis and accurate antimycotic pharmacotherapy [1]. The main causative agent of invasive candidiasis is *Candida albicans*, but with the advancement of molecular biology techniques of identification an increase in the number of detections of non-*albicans* species has been observed, and this is associated with reduced antifungal susceptibility and outbreaks [2].

The pharmacotherapy available for the systemic treatment of *Candida* infections includes triazole agents (fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, ravuconazole and albaconazole), echinocandins (caspofungin, micafungin and conventional anidulafungin and antidotefine) and flucytosine. Although first-line drugs (triazole agents and echinocandins) are effective, some species of *Candida* are naturally resistant to them. In addition, there is a growing index of strains resistant to multiple drugs [3].

Due to the limitations of conventional antifungals and the resistance presented by *Candida* species, the search for new pharmacotherapeutic alternatives is increasingly

necessary. The research of synthetic drugs has grown considerably in the last few years due to the agility in the processing and the capacity of molecular modeling, becoming a tool of great importance for the development of drugs with safer and more efficient properties [4].

The synthetic compound 2-bromo-*N*-phenylacetamide, with C_8H_8BrNO molecular formula, is obtained from an acetylation reaction between aniline and bromoacetyl bromide. This substance is commonly used in chemical sciences as an intermediary for chemical reactions [5], however, its antimicrobial activity is not yet described in the literature, which provides a potential source for investigation.

Given this context, this study aimed to evaluate the antifungal activity of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide against invasive candidiasis isolates, by determining the minimum inhibitory and fungicide concentrations. In addition, molecular docking was performed, to investigate the possible mechanism of action of the substance. The substance was also associated with fluconazole, to assess the viability of the combination in clinical practice.

EXPERIMENTAL

Chemistry

All reagents and solvents were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). NMR spectroscopic data were recorded with a Bruker Avance 400 instrument. 1H NMR spectroscopic data were recorded in DMSO at 500 MHz using the residual non-deuterated solvent as an internal standard (δ_H 2.50 ppm). ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO at 126 MHz using the deuterated solvent as an internal standard (δ_C 39.52 ppm), and tetramethylsilane (TMS) was used for the internal standard. Chemical shifts (δ) were measured in parts per million (ppm), and the coupling constants (J) in hertz (Hz). The spectra (IR) were obtained on a Shimadzu model IRPrestige-21 FTIR spectrometer, with an attenuated total reflection (ATR) accessory. The purification of the compound was performed by recrystallization in ethanol/water and confirmed by determining the melting range on an MQAPF-302 hotplate (microquímica).

Preparation of 2-Bromo-N-phenylacetamide (A1Br)[5]

In a 50 mL flask containing aniline (1.86 g, 0.020 mol) and K_2CO_3 (3.31 g, 0.024 mol) solubilized in 20 mL of $CHCl_3$ at a temperature of 0 °C, 2-bromoacetyl bromide (4.84 g, 0,024 mol) is slowly added. The ice bath was then removed, and the reaction stayed under agitation for 20 h at room temperature. The reaction mixture was monitored

by TLC (hexane/methyl acetate 1:1). At the end of the reaction, the reaction mixture was filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure, yielding a precipitate. The solid was obtained by the recrystallization method using ethanol/water (8:2). Yield: 80 % M.P. 130-132 °C (Lit.: [6] 129-131°).

IR (cm^{-1} , ATR): 3294 (NH), 3145, 3099 (CH_{Ar}), 1654 (C = O), 1606 (N-H), 1554, 1496 ($C=C_{Ar}$), 1444 (CH_2), 1111 (C – Br), 758 (CH_{Ar}).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.85 (s, 1H, N-H), 7.53 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.22 (t, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.01 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.89 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 164.64, 137.88, 128.36, 123.84, 119.47, 29.41.

Antimicrobial activity

Microorganisms

The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Paraíba, under the number 3.715.836. Ten clinical isolates of *C. albicans* (117, 516, 587, 616, 699, 700, 800, 807, 814 and 917) and five isolates of the *C. parapsilosis* complex (439, 546, 689, 5770 and 55117) were used, which came from patients with invasive candidiasis assisted at Hospital Universitário Lauro Wanderley (João Pessoa, Brazil). The identification and characterization of the sensitivity profile against antifungals was carried out using the Candifast kit (International Microbio), complemented by microscopic and biochemical techniques. As controls, *C. albicans* ATCC 76485 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used. *Candida* cultures were grown on sabouraud dextrose agar and incubated at 35 ± 2 °C for 24-48 h. After this period, colonies were suspended in sterile saline (0.85 %) and the turbidity was adjusted to obtain the final inoculum concentration with 10^6 CFU mL^{-1} [7, 8].

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC determination was performed based on the standard recommendations [9], using the broth microdilution technique in a 96-well plate to obtain different concentrations of A1Br.

Initially, 100 μ L of double strength RPMI-1640 broth (Sigma-Aldrich/ Merck) was added to the wells, and 100 μ L of the test product was subsequently added. Serial microdilutions were performed in which a 100 μ L aliquot from a well containing more concentrated medium was transferred to the next well with less concentrated medium, producing final A1Br concentrations ranging from 2048 to 0.5 μ g/mL. Finally, 10 μ L of *Candida* spp. inoculum was added to the wells such that each column contained

a different strain. At the same time, the sterility controls of the culture medium, viability of the strains and interference of the vehicles used in the preparation of A1Br emulsions (DMSO and Tween-80) were also performed. MIC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of yeasts growth after 24-48 h at 35 ± 2 °C.

Determination of the minimum fungicide concentration (MFC)

After MIC reading, MFC was determined by removing aliquots from the microdilution plates in the wells corresponding to concentrations equivalent to MIC, 2 x MIC, 4 x MIC and 8 x MIC and inoculating in new plates containing only culture broth. All controls were performed in parallel. MFC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of yeasts after 24-48 h at 35 ± 2 °C. Thus, it is possible to determine whether the substance acts as a fungicidal or fungistatic agent [10].

Molecular docking

The Molegro Virtual Docker (MVD) software [11] (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Denmark) was used to analyze the interactions of A1Br with membrane and cell wall enzymes of *Candida* spp. The crystallographic structure of exo- β -(1,3)-glucanase (cell wall) and 14- α -demethylase (cell membrane) were acquired from Protein Data Bank [12] under the codes 1EQC (1.85 Å) and 5TZ11 (2 Å), respectively. The water molecules were removed from the enzyme structure.

Checkerboard assay

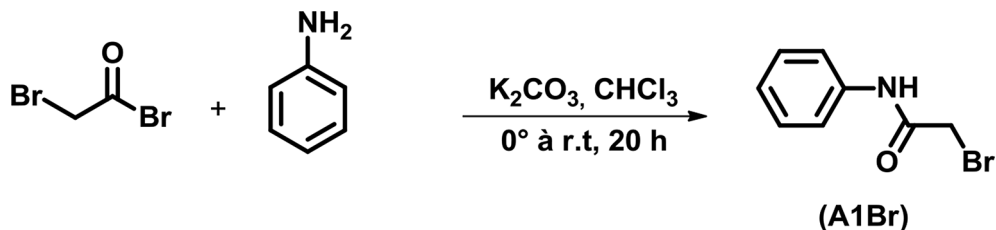
To check the effect of the association of A1Br with fluconazole, the checkerboard method was performed. Thus, different concentrations of A1Br (8 x MIC, 4 x MIC, 2 x MIC, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC) were combined with different concentrations of fluconazole (8 x MIC, 4 x MIC, 2 x MIC, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC) and then fungal inoculum was added. All controls were performed in parallel. The reading of the experiment was done after incubation at 35 ± 2 °C for 24-48 h to observe the presence or not of the visible yeast's growth.

The effect produced between the combinations was determined by the fractional inhibitory concentration index (FICI). This index was calculated by the sum of fractional inhibitory concentrations (FIC), where $FIC_A = (\text{MIC of substance A in combination}) / (\text{MIC of substance A alone})$ and $FIC_B = (\text{MIC of substance B in combination}) / (\text{MIC of substance B alone})$, thus $FICI = FIC_A + FIC_B$. The association was defined as synergistic for $FICI \leq 0.5$, as additive for $0.5 < FICI < 1$, as indifferent for $1 \leq FICI < 4$, and as antagonistic for $FICI \geq 4$ [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

The synthesis of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) was performed in a single synthetic step, using the procedures described by Kaushik *et al.* [5] and the representation of the synthetic is described in scheme 1.



Scheme 1. Synthetic route for the 2-Bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br).

2-Bromo-*N*-phenylacetamide was prepared from the acetylation reaction using aniline and bromoacetyl bromide as the acylating agent in the presence of potassium carbonate as the base and in chloroform as a solvent at room temperature for 20 h. The structure of A1Br was confirmed using infrared (IR) (figure 1) and ^1H (figure 2) and ^{13}C (figure 3) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy techniques.

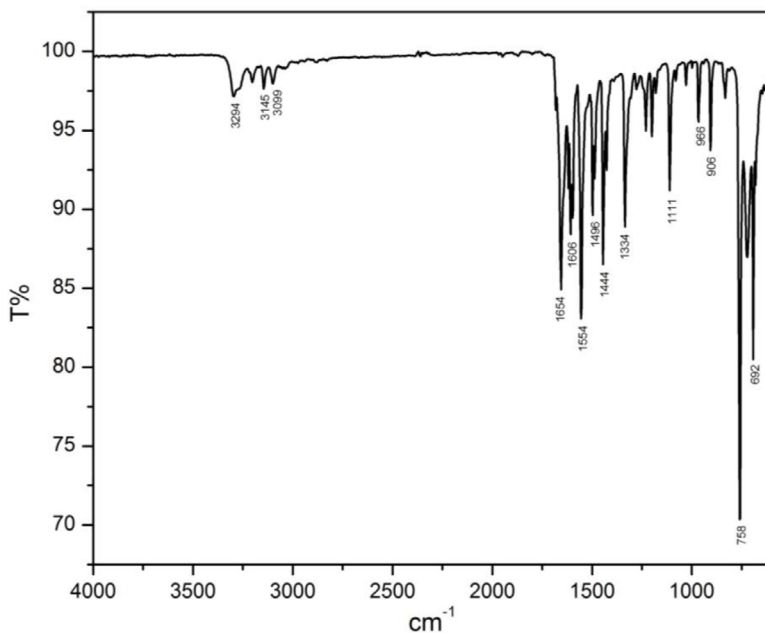


Figure 1. FTIR (ATR) spectrum of compound 2-Bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br).

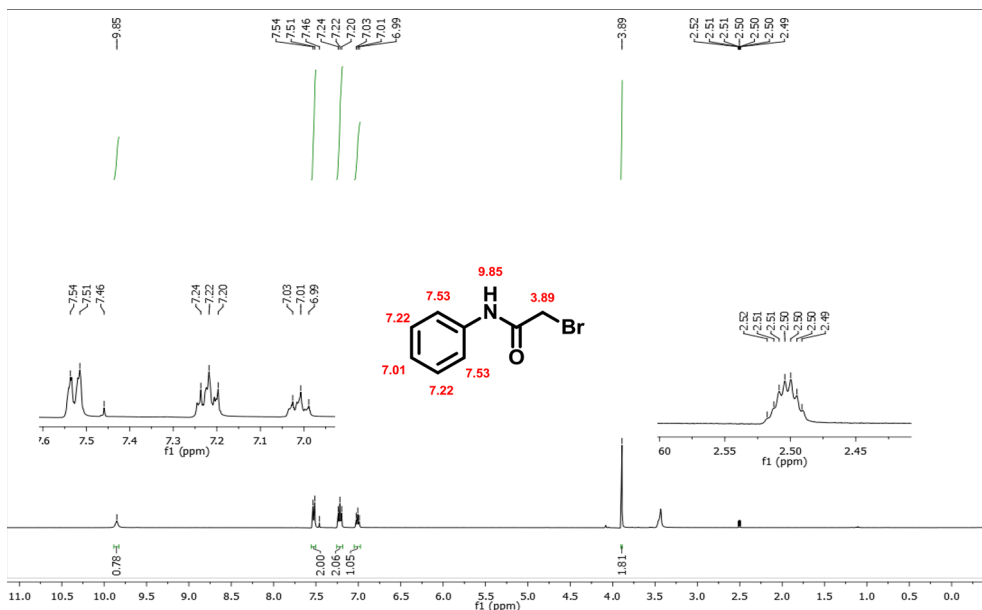


Figure 2. ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) of compound 2-Bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br).

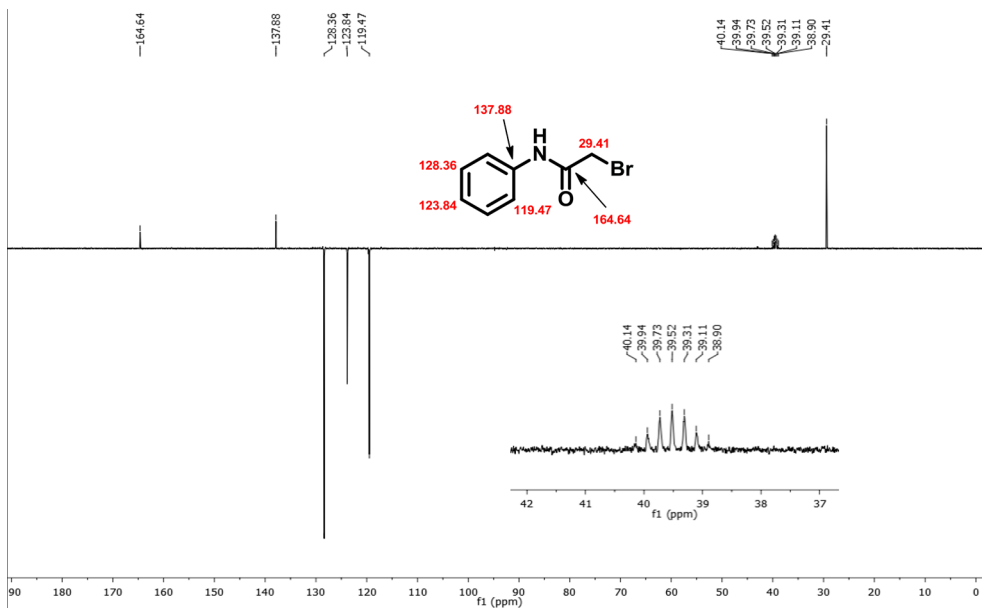


Figure 3. ^{13}C NMR spectrum (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) of compound 2-Bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br).

Antimicrobial study

All strains analyzed were sensitive to the antifungal agents, amphotericin B, nystatin, flucytosine, ketoconazole and miconazole. However, it was identified that 41.2 % of the strains were resistant to fluconazole. Regarding the sensitivity to 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, the results are shown in table 1.

Table 1. Minimum inhibitory and fungicide concentrations (MIC and MFC) of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide against invasive candidiasis isolates.

Strains		2-Bromo- <i>N</i> -phenylacetamide	
		MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>C. albicans</i>	ATCC 76486	8	16
	117	8	16
	516	8	16
	587	8	16
	616	4	8
	699	4	8
	700	16	32
	800	16	32
	807	16	32
	814	8	16
	917	8	16
<i>C. parapsilosis</i> Complex	ATCC 22019	32	64
	439	32	64
	546	32	64
	689	16	32
	5770	16	32
	55117	16	32

The MIC of 2-bromo-*N*-phenylacetamide ranged from 4 to 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. albicans* and between 16 to 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the *C. parapsilosis* complex. Thus, it is observed that all strains used in this study were susceptible to the action of A1Br, with 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ being the maximum concentration necessary to lead to cell unfeasibility.

A drug is considered to exhibit fungicidal activity against a particular isolate when the MFC/MIC ratio is ≤ 4 [14]. In this way, the mode of action of A1Br is classified as fungicide, since the MIC/MFC ratio was less than 4 for both species tested. That is, this acetamide is capable of causing death in the yeast cells, instead of just reducing its growth, which would mean a fungistatic activity.

Molecular docking analysis

Molecular docking was used to evaluate the interactions and binding of A1Br in different structures of *Candida* spp, in order to observe a possible site of action in the fungal cell. The molecule showed binding energies of $-57.45\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-64.07\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the enzymes $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)-glucanase}$ (cell wall) and $14\text{-}\alpha\text{-demethylase}$ (cell membrane), respectively, indicating that there is a higher affinity with fungal cell membrane (figure 3).

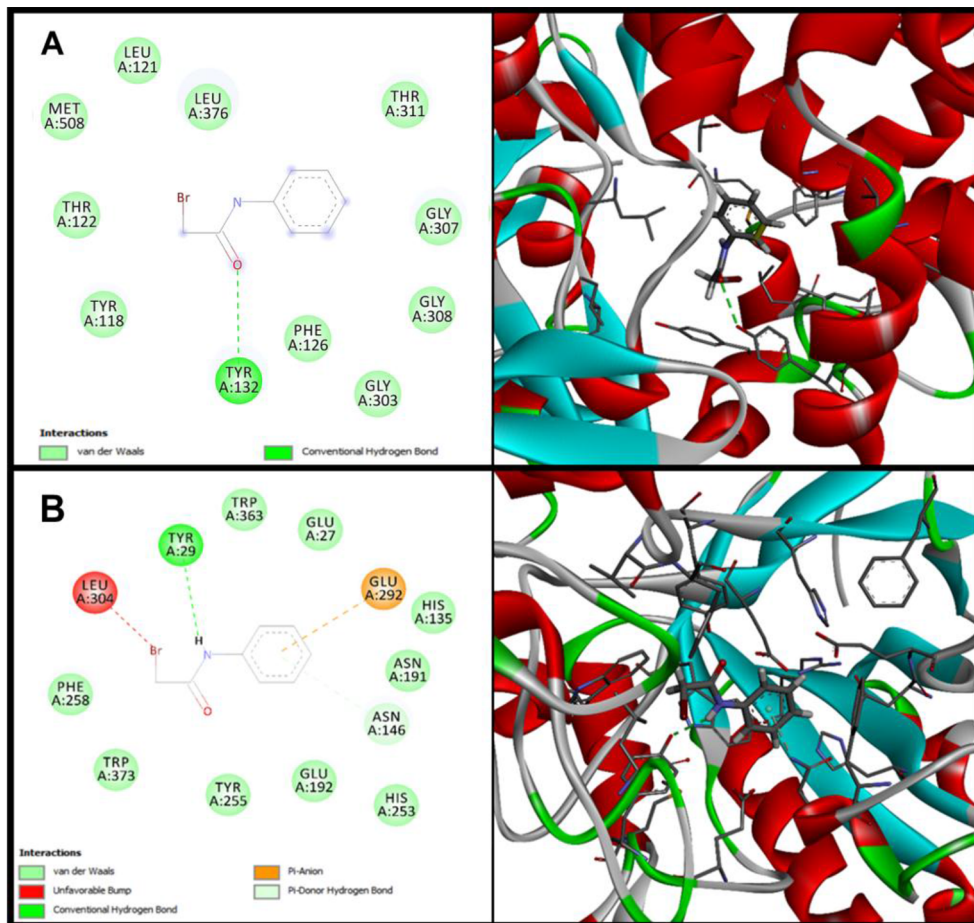


Figure 3. Interactions of 2-Bromo-*N*-phenylacetamide at the active enzymatic sites of the cell membrane (A) and cell wall (B) in *Candida* spp.

Thus, the results suggest that A1Br possibly acts by interfering in the fungal cell membrane, since it presented binding energies favorable to the interaction with the enzyme, similar to those performed by the co-crystallized inhibitor [15, 16]. However, *in vitro* studies are necessary to confirm this mechanism of action. The validation of molecular

docking was performed through redocking, using the values of RMSD (Root Mean Standard Deviation) 0.95 Å (5TZ1) and 0.15 Å (1EQC) [11].

With the perspective of identifying a pharmacological tool that can be used in association with fluconazole against resistant strains, the association test was performed with the seven resistant strains identified in the present study: 516, 587, 616, 700, 814, 917 and 439. The FICI indices ranged from 1.002 to 2.062, thus, the association between 2-Bromo-*N*-phenylacetamide and fluconazole was classified as indifferent for all strains [17, 18]. It is important to emphasize that although the results of this association have been indifferent, the possibilities of association with other drugs should be investigated later, since they can bring interesting results for therapy [19, 20].

CONCLUSION

In view of the above, it is possible to observe that 2-Bromo-*N*-phenylacetamide has a notorious antifungal activity, which had not yet been explored. In this way, this study sheds light on this compound and opens perspectives for its potential to be better elucidated, as it can become a promising drug candidate for application in clinical practice against invasive candidiasis, as well as against other fungal infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. A.M. Doi, A.C.C. Pignatari, M.B. Edmond, A.R. Marra, L.F.A. Camargo, R.A. Siqueira, V.P. Mota, A.L. Colombo, Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program, *PLoS One*, **11**(1), e0146909 (2016).

2. M.F. Gonzalez-Lara, L. Ostrosky-Zeichner, Invasive candidiasis, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 3. 4. , **41**(01), 3-12 (2020).
3. M.C. Arendrup, T.F. Patterson, Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment, *The Journal of Infectious Diseases*, **216**(Suppl. 3), S445-S451 (2017).
4. A. Moraes-Nicola, P. Albuquerque, H. Costa-Paes, L. Fernandes, F.F. Costa, E. Seli-Kioshima, A.K. Rodrigues-Abadio, A. Lorenzetti-Bocca, M. Sueli-Felipe, Antifungal drugs: new insights in research & development, *Pharmacology & Therapeutics*, **195**, 21-38 (2019).
5. C.P. Kaushik, R. Luxm, M. Kumar, D. Singh, K. Krishan, A. Pahwa, One-pot facile synthesis, crystal structure and antifungal activity of 1,2,3-triazoles bridged with amine-amide functionalities, *Synthetic Communications*, **49**(1), 118-128 (2019).
6. H. Xie, D. Ng, S.N. Savinov, B. Dey, P.D. Kwong, R. Wyatt, A.B. Smith, W.A. Hendrickson, Structure-activity relationships in the binding of chemically derivatized CD4 to gp120 from human immunodeficiency virus, *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**(20), 4898-4908 (2007).
7. L. Cleeland, E. Squires, Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections, in: V. Lorian (editor), *Antibiotics in laboratory medicine*, Williams & Wilkins, Baltimore (MD), 1991, p. 739-788.
8. F. Hadacek, H. Greger, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, **11**(3), 137-147 (2000).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard*, 2nd edition, NCCLS, Wayne, 2008, 29 p.
10. L. Sousa-Pinheiro, A.A. de Oliveira Filho, F. Queiroga-Sarmiento-Guerra, C. Pinheiro de Menezes, S. Golzio dos Santos, J. Pereira de Sousa, T. Barbosa-Dantas, E. De Oliveira-Lima, Antifungal activity of the essential oil isolated from *Laurus nobilis* L. against *Cryptococcus neoformans* strains, *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, **7**(5), 115-118 (2017).
11. R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: A new technique for High-Accuracy Molecular Docking, *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**(11), 3315-3321 (2006).

12. RCSB PDB, <https://www.rcsb.org>, accessed in March 2020.
13. X. Wu, Z. Li, X. Li, Y. Tian, Y. Fan, C. Yu, B. Zhou, Y. Liu, R. Xiang, L. Yang, Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria, *Drug Design, Development and Therapy*, **11**, 939-946 (2017).
14. D. Hall, R. Bonifas, L. Stapert, M. Thwaites, D.L. Shinabarger, C.M. Pillar, *In vitro* potency and fungicidal activity of CD101, a novel echinocandin, against recent clinical isolates of *Candida* spp., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **89**(3), 205-211 (2017).
15. T.Y. Hargrove, L. Friggeri, Z. Wawrzak, A. Qi, W.J. Hoekstra, R.J. Schotzinger, J.D. York, P. Guengerich, G.I. Lepesheva, Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry*, **292**(16), 6728-6743 (2017).
16. S.M. Cutfield, G.J. Davies, G. Murshudov, B.F. Anderson, P.C.E. Moody, P.A. Sullivan, J.F. Cutfield, The structure of the exo- β -(1,3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases, *Journal of Molecular Biology*, **294**(3), 771-783 (1999).
17. R.E. Lewis, D.J. Diekema, S.A. Messer, M.A. Pfaller, M.E. Klepser, Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**(2), 345-351 (2002).
18. J. Correa-Royero, V. Tangarife, C. Durán, E. Stashenko, A. Mesa-Arango, *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**(5), 734-741 (2010).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

R. Pereira de Moura-Sousa, D. de Figuerêdo-Silva, N.M. Cavalcante-Oliveira, Z.B. Vieira da Silva-Pontes, H. Diniz-Neto, L. Vilar-Cordeiro, P.T. Ramalho de Figueiredo, R. Farias de Oliveira, H.D. da Silva Souza, P. Filgueiras de Athayde Filho, E. de Oliveira-Lima, *In silico* and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 695-707 (2021).

Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil

Niuanne Thais Alves Coelho¹, Raquel Salviano da Silva¹, Giovana Morais Delmondes¹, William Gustavo Lima², Carlos Eduardo de Matos Jensen³, Magna Cristina de Paiva^{1*}

¹Laboratório de Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

²Farmacêutico-Bioquímico, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author e-mail address: magnacpaiva@ufsj.edu.br

Received: October 19, 2019

Corrected: March 26, 2021

Accepted: March 29, 2021

SUMMARY

Introduction: The capacity of resistance to β -lactam among enterobacteriales is notable, mainly into water environment. Herein, many species of this family have the ability to carrier and produce β -lactamases enzymes, such as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases. However, contrary to clinical settings, where the distribution of resistant bacteria is well documented, the evidence of resistant pathogens in the domestic sewage has been little explored, especially in Brazil. Thus, we aimed to investigate the occurrence of ESBL and carbapenemases between ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil. **Methods:** Enterobacteriales were isolated from sewage samples on MacConkey agar supplemented with ampicillin. Species identification was performed by biochemical and morphological methods and the resistance profile determined by the Kirby-Bauer test. The production of ESBL and carbapenemase was investigated in all isolates by phenotypic tests. **Results and discussion:** A total of 45 species of enterobacteriales resistant to ampicillin were recovered (37

Escherichia coli, four *Klebsiella pneumoniae*, and one *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* and *Pantoea agglomerans*). Most isolates showed a high β -lactam susceptibility profile (14/45, 31.1 %), however *E. coli* with decreased susceptibility to imipenem was detected (2/37; 2.7 %). ESBL-positive isolates were mostly identified as *E. coli* (10/45; 22.2 %), but no isolates were positive carbapenemase. **Conclusion:** Domestic sewage is an important source of β -lactams resistant determinants in Brazil.

Keywords: Enterobacteriales, antibiotic resistance, environmental samples, carbapenemase, beta-lactamase, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*.

RESUMO

Ocorrência de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases entre enterobacteriales resistentes à ampicilina recuperadas de esgoto bruto municipal em Minas Gerais, Brasil

Introdução: a capacidade de resistência aos beta-lactâmicos entre enterobacteriales é notável, principalmente no ambiente aquático. Nessa direção, muitas espécies desta família têm a capacidade de transportar e produzir enzimas β -lactamases, especialmente a β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases. Porém, ao contrário do cenário clínico, onde a distribuição de bactérias resistentes é bem documentada, as evidências de patógenos resistentes no esgoto doméstico têm sido pouco exploradas, principalmente no Brasil. Assim, objetivamos investigar a ocorrência de ESBL e carbapenemases entre enterobacteriales resistentes à ampicilina recuperadas de um esgoto bruto municipal em Minas Gerais, Brasil. **Métodos:** enterobacteriales foram isoladas de amostras de esgoto em ágar MacConkey suplementado com ampicilina. A identificação das espécies foi realizada por métodos bioquímicos e morfológicos e o perfil de resistência determinado pelo teste de Kirby-Bauer. A produção de ESBL e carbapenemase foi investigada em todos os isolados por testes fenotípicos. **Resultados e discussão:** foram recuperadas 45 isolados de enterobacteriales resistentes à ampicilina (37 *Escherichia coli*, quatro *Klebsiella pneumoniae* e uma *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* e *Pantoea agglomerans*). A maioria dos isolados apresentou um perfil de alta susceptibilidade aos β -lactâmicos (14/45, 31,1 %), porém *E. coli* com susceptibilidade diminuída ao imipenem foi detectada (2/37; 2,7 %). Os isolados ESBL-positivos foram identificados principalmente como *E. coli* (10/45; 22,2 %), mas nenhum isolado foi positivo para a carbapenemase. **Conclusão:** o esgoto doméstico é uma importante fonte de determinantes de resistência aos β -lactâmicos no Brasil.

Palavras-chave: enterobacteriales, resistência a antibióticos, amostras ambientais, carbapenemase, beta-lactamase, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*.

RESUMEN

Ocurrencia de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas entre enterobacteriales resistentes a ampicilina recuperados de un alcantarillado municipal en Minas Gerais, Brasil

Introducción: la capacidad de resistencia a betalactámicos entre enterobacteriales es notable, principalmente en el medio acuático. En este sentido, muchas especies de esta familia tienen la capacidad de transportar y producir enzimas β -lactamasas, especialmente β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas. Sin embargo, en contraste con el escenario clínico, donde la distribución de bacterias resistentes está bien documentada, la evidencia de patógenos resistentes en las aguas residuales domésticas ha sido poco explorada, especialmente en Brasil. Por lo tanto, nuestro objetivo es investigar la ocurrencia de BLEE y carbapenemasas entre enterobacteriales resistentes a ampicilina recuperadas de un alcantarillado municipal sin tratar en Minas Gerais, Brasil. **Métodos:** se aislaron enterobacteriales de muestras de aguas residuales en agar MacConkey suplementado con ampicilina. La identificación de las especies se realizó mediante métodos bioquímicos y morfológicos y el perfil de resistencia se determinó mediante la prueba de Kirby-Bauer. La producción de BLEE y carbapenemasa se investigó en todos los aislamientos mediante pruebas fenotípicas. **Resultados y discusión:** se recuperaron 45 aislamientos de enterobacteriales resistentes a ampicilina (37 *Escherichia coli*, cuatro *Klebsiella pneumoniae* y una *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* y *Pantoea agglomerans*). La mayoría de los aislamientos tenían un perfil de susceptibilidad alto a los β -lactámicos (14/45, 31,1 %), pero se detectó *E. coli* con susceptibilidad reducida al imipenem (2/37; 2,7 %). Los aislamientos positivos para BLEE se identificaron principalmente como *E. coli* (10/45; 22,2 %), pero ningún aislado fue positivo para carbapenemasa. **Conclusión:** las aguas residuales domésticas son una fuente importante de determinantes de la resistencia a los β -lactámicos en Brasil.

Palabras clave: Enterobacteriales, resistencia antibiótica, muestras ambientales, carbapenemasa, betalactamasa, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*.

INTRODUCTION

The enterobacteriales comprises a large group of Gram-negative, glucose-fermenters and non-spore-forming bacteria with typically 0.8-5.0 μm in length. These microorganisms are widely distributed, been founded in various sites of the human and animal body, as well as in the environment and food samples [1]. Although strains of some species are harmless commensals, others are potentially pathogenic to humans, animals, insets and plants. The members of this order are closely related with the most common opportunistic infections and are associated to several complex diseases including septicemia, pneumonia, meningitis and urinary tract infections [2].

Generally, for the treatment of infections caused by enterobacteriales, several antimicrobials are used, especially the class of beta-lactam antibiotics (e.g., penicillins, cephalosporins, monobactams and carbapenems) [3, 4]. In susceptible microorganisms, the beta-lactam antibiotics are bactericidal agents that irreversibly inhibit the enzyme transpeptidase that catalyzes reactions between the peptideoglycan chains of the bacterial cell wall [5]. Among these antimicrobials, ampicillin, a semi-synthetic penicillin discovered in 1961, has an important role in therapy of enterobacteriales infections. However, as with other antimicrobials, the exacerbated use of ampicillin as prophylactic or therapeutic in veterinary and agrarian practices contributes to emergence and dissemination of resistance against this compound [6].

It has been described that the main mechanism of resistance to ampicillin in enterobacteriales is the production of Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) [7]. ESBLs are a rapidly evolving group of β -lactamases which share the ability to hydrolyze penicillins; first-, second-, and third-generation cephalosporins; and aztreonam (but not the cephamycins such as cefoxitin or carbapenems), and are inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid [8-10]. The majority of ESBLs are derived from the widespread broad-spectrum β -lactamases TEM and SHV. There are also others families of ESBLs, including the CTX-M and OXA-type enzymes as well others unrelated β -lactamases (e.g., PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1, GES-1) [11]. The ESBLs are widely distributed and can spread easily since the genes encoding them can be transferred via mobile genetic elements, such as plasmids, transposons and integrons [12]. In the clinical setting, ESBL-producing enterobacteriales are associated with increased mortality rates and high health costs [13].

The increase in infections caused by ESBL-positive enterobacteriales led to a greater use of carbapenems, thus promoting the emergence of resistant strains to this class [14]. Bacterial resistance to carbapenems is observed due to the reduction of bacterial outer membrane permeability, expression of efflux pumps, site mutation and enzymatic hydrolysis (i.e., carbapenemase production) of the antimicrobial; this latter is of greater concern to the biomedical community due to the high potential of dissemination interspecies [15]. The most frequent carbapenemases in Gram-negative bacteria belong to class A (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- KPC; Guiana extended spectrum-GES); class B (New Delhi metallo-beta-lactamase-NDM; Verona imipenem-VIM; Imipenem-IPM) and class D (Oxacillinases-OXA-48, OXA-181) from Ambler and are transferred by mobile genetic elements. These enzymes can be detected using phenotypic tests, but detection of the gene encoding *bla* is considered gold standard [16-18].

Beta-lactamase-producing bacteria outside the clinical setting have showed to contribute with the postulated decline of the efficacy of beta-lactam antibiotics worldwide. Especially raw sewage seems to play a key role in this spread, as they serve both as habitats and as transport systems for microorganisms. For instance, in Brazil is estimated that approximately 20 % of the medicaments are discarded in the sewage network or household wastewater [19]. Regarding the antimicrobials, they are not fully metabolized in the body, and are released to the effluent through excreta from the patient. A major concern is the easy adaptation of bacterial population, since the subconcentrations of antimicrobials may exert selective pressure on the bacterial, selecting resistant strains [20]. As a result, these environments have been considered reservoirs of bacterial resistance to antimicrobials [21].

However, contrary to clinical settings, where the distribution of resistant bacteria is well documented, distribution and evidence of resistant pathogens in the domestic sewage has been little explored, especially in developing countries such as Brazil. Our group already has showed that *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a domestic wastewater treatment plant (WWTP) localized in Minas Gerais state (Brazil) is able to carried beta-lactamases (AmpC) and has considerable resistance rate to carbapenems (11 %), suggesting that the sewage is a potential reservoir of resistance determinants against beta-lactam in this region [22]. Thus, considering the importance of beta-lactam against glucose-fermenter Gram-negative bacilli and the circulation of ESBL and carbapenemase-producing microorganisms in sewage, this study aimed to investigate the occurrence of ESBL and carbapenemases between ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

One liter of sewage in direct and spontaneous drainage for a watercourse in the city of Divinópolis (MG) (geographical coordinates: 20° 08' 20" S and 44° 53' 02" W), localized in southeast Brazil (232 945 inhabitants), was collected on 6th of June 2017 [22]. The sample was placed in pre-sterilized screw-cap polypropylene vial, stored on ice until analyzed and was processed within two hours of collection at the *Laboratório de Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica* at the Universidade Federal de São João del-Rei (Divinópolis-MG/Brazil).

Cultures and bacterial isolation

In order to isolate the enterobacteriales species, the entire sewage sample was centrifuged and then 2 grams of the sediment was inoculated into BHI broth (Isifar, Brazil) plus ampicillin (640 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Germany). Subsequently, a serial dilution of the 100 µL sample of each dilution and of the raw sample was inoculated on MacConkey agar (Isifar, Brazil) added of ampicillin (288 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Germany). The concentration of ampicillin used is in accordance with the Manual of the Clinical Laboratory Standards Institute M100 S28 where enterobacteriales isolates for which the minimum inhibitory concentration (MIC) is ≥ 32 µg/mL are considered resistant to this antimicrobial [23].

In order to identify the bacterial species, the Gram staining technique and biochemical-physiological tests were used [24], including the production of oxidase enzyme, fermentation of carbohydrates (glucose, lactose and sucrose), pigment production, lysine decarboxylation, indole production, H₂S production, use of citrate and malonate as the carbon source and urease production. In addition, chromogenic agar (Renylab, Brazil) was also used to identify the colonies, according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the bacterial isolates were inoculated in nutrient agar to verify the purity of the culture by evaluating the morphology of the colonies. From this culture, three to five colonies were suspended in BHI broth and incubated at 37 °C for a period of 18-24 h. After this incubation, 500 µL of the culture was added with 25 % v/v glycerol and stored at -80 °C.

Beta-lactams susceptibility test

The antimicrobial susceptibility profile of aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO), amoxicillin with clavulanic acid (AMC) (Sensifar) and carbapenems (meropenem, MEM; imipenem, IMP and ertapenem, ERT) (Cecon, Brazil) was determined by the standard agar diffusion technique and interpreted according to the Manual of the Clinical Laboratory Standards Institute M100 S28, considering the breakpoints established by it. *Escherichia coli* ATCC 25 922 was used as control of the experiments [23].

Phenotypic detection of the production of carbapenemases and ESBL

The enterobacteriales isolates were submitted to phenotypic tests to determine the production of carbapenemases using the modified Hodge test (MHT) and inactivation of carbapenems (mCIM and eCIM). Briefly, the MHT was performed using an *E. coli* ATCC 25 922 inoculum prepared according to the 0.5 McFarland standard in nutrient broth (Isifar, Brazil). Subsequently, this suspension was inoculated onto the surface of a Mueller-Hinton agar (Isifar, Brazil) with [25] and without [23] 50 microliters of Triton X-100 previously added. Next, a meropenem disk was placed in the center of the plaque. Using a 10 μ L loop, three to five colonies of each test species freshly grown in nutrient agar (Isifar, Brazil) were inoculated in a straight line from the end of the plate to the center of the disc. After incubation at 35 ± 2 °C for 16-20 h, the plate was analyzed. If a carbapenemase is produced by the test bacterium, the antimicrobial will be hydrolyzed, allowing *E. coli* ATCC 25 922 to grow toward the disc, creating a distortion of the inhibition halo.

To perform the mCIM test [23], in turn, three to five colonies of each bacterial isolate grown from blood agar were inoculated into 2 mL of nutrient broth (Isifar, Brazil). Simultaneously, a meropenem disk was placed in each test tube and it was incubated at 35 ± 2 °C for 4 h. Upon completion of the incubation, a suspension of *E. coli* ATCC 25922 with turbidity pattern compatible with the 0.5 McFarland scale was inoculated on the Mueller Hinton agar plate (Isifar, Brazil). The meropenem disks removed from the tubes were placed on the Muller Hinton agar plate previously inoculated with the *E. coli* ATCC 25922 indicator strains and the plates were incubated at 35 ± 2 °C. If carbapenemase is produced, the carbapenem is inactivated during incubation, allowing the growth of *E. coli* ATCC 25922, with the formation of an inhibition halo of less than 15 mm [23]. Simultaneously with the mCIM test, the eCIM test [23] was performed, which presents as a modification of the procedure described above, the use of a tube of nutrient broth from each isolate containing 20 μ L of 0.5 M EDTA. According to CLSI [23], this procedure allows the differentiation of carbapenemases type. In experiments to search of carbapenemase, *E. coli* ATCC 25 922 and clinical carbapenemase-positive- *K. pneumoniae* were used, respectively, as negative and positive controls.

In addition, the isolates were submitted to the phenotypic test to determine ESBL production, using the antimicrobial substrates CAZ, ATM, CRO and CTX, according to CLSI protocol [23]. Briefly, a suspension of each bacterial isolate (concentration 10^8 UFC/mL) was inoculated into Muller-Hinton agar (Alere, USA). The antimicrobial discs were then arranged around the AMC disc at a distance of 20 mm and incubated at 37 °C for 24 h. The isolate is considered an ESBL producer when a halo distortion of antimicrobial substrate

is observed after incubation. *E. coli* ATCC 25922 and clinical ESBL-positive- *Klebsiella pneumoniae* were used, respectively, as negative and positive controls.

RESULTS AND DISCUSSION

Currently, raw sewage is recognized as one of the most important routes for propagation of AMR genes worldwide. Recent evidences showed that antibiotic resistance in urban sewage mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence, making the search for resistance determinants in these residues an indirect way of epidemiological surveillance of multi-resistant microorganisms [7]. Despite the large number of studies that highlights the importance of sewage in dissemination of antibiotic resistance in Europe and EUA, the dynamic of this phenomenon has been little explored in Brazil [26]. However, Hendriksen *et al.* [27], in a metagenomic analysis of untreated sewage to characterize the bacterial resistome from 79 sites in 60 countries, showed that the Brazil had the highest abundance of AMR genes of all countries studied (4616.9 fragments per kilobase per million) (Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage). Thus, we have aimed to determine the resistance profile and presence of beta-lactamase among ampicillin-resistance enterobacteriales recovered from an urban raw sewage in a medium-sized city from southeast Brazil.

Here, 45 bacterial isolates were recovered from the domestic sewage in ampicillin-enriched medium (640 µg/mL). Overall, five different species were identified, been them *Escherichia coli* (37/45; 82.2 %), *Klebsiella pneumoniae* (4/45; 8.9 %), *Klebsiella oxytoca* (1/45; 2.2 %), *Citrobacter freundii* (1/45; 2.2 %) and *Pantoea agglomerans* (1/45; 2.2 %). In fact, these species are often recovered in both domestic [28, 29] and hospital sewage [7], the latter characterized by the great exposure of the bacterial population to various antimicrobials, including ampicillin.

The highest number of *E. coli* isolates (82.2 %) is possibly associated with the fact that this species is part of the intestinal microbiota of humans and animals. As in our study, this species was also the most recovered by Korzeniewska and Harnisz [30] in a municipal sewage. However, it is worth mentioning that *E. coli* is also responsible for approximately 50 % of health care-related infections and 70-90 % of urinary tract infections [31]. In fact, acute community-acquired urinary tract infections (CA-UTIs) caused by *E. coli* are the most common bacterial infections worldwide, affecting approximately 150 million persons per year, particularly women [32]. Of particular concern is that the isolates recovered here are resistant to ampicillin, an antimicrobial widely used in the clinical setting.

Species of the genus *Klebsiella* and *Citrobacter* were also recovered, but to a lesser extent. These bacteria are considered as coliforms because they inhabit the gastrointestinal tract, but can also be found in pastures, soils and submerged plants [33]. Already the *P. agglomerans*, formerly known as *Enterobacter agglomerans*, is a clinically important species. It is associated with plants, but has been the cause of opportunistic infections mainly in plant-related wounds or infections related to health care in immunocompromised patients [34]. Possibly this finding is because this species is present in plants located near the domestic sewage.

All bacterial isolates from this study were submitted to the susceptibility test for several beta-lactam agents by the agar diffusion method (table 1). In general, a moderate beta-lactam resistance rate (14/45, 31.1 %) was observed among the isolates. An important finding in this work was that all the isolates of *Klebsiella* spp. and *C. freundii* were sensitive to the tested beta-lactam antibiotics (AMC, CTX, CRO, CAZ, ATM, MEM, IMP, ERT). Thus, our data show that these species may have limited resistance mechanisms, which cover only ampicillin as intrinsic resistance in *Klebsiella* spp. Corroborating with this study, *Klebsiella* spp. and *C. freundii* exhibiting resistance to this beta-lactam have been found in water samples from Latin America. Oliveira [35] relates that 52 % of enterobacteriales isolates from water samples in Porto Alegre-RS (including *K. pneumoniae* and *C. freundii*) are resistant to ampicillin. In turn, Castañeda *et al.* [36] demonstrated resistance to ampicillin involving all isolates of *Klebsiella* and *Citrobacter* recovered from marine water and beach sediments in Venezuela. Possibly ampicillin resistance in these bacteria may be related to the widespread use of this drug, which is available for a longer time in the market.

Table 1. Susceptibility profile to beta-lactam antimicrobials and distribution of ESBL-producing isolates among ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from raw sewage.

Isolated species (n = 45)	ESBL production	Susceptibility profile to beta-lactam							
		AMC	CAZ	CTX	ATM	CRO	MEM	IPM	ERT
<i>Escherichia coli</i>	-	I	S	I	S	I	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S

Extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemases among ampicillin-resistant enterobacteriales

<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	R	R	I	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	I	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>Escherichia coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S

<i>Pantoea agglomerans</i>	+	R	R	R	R	R	S	S	S
----------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase; S: Sensible, R: Resistant; I: Intermediary; AMC: Amoxicillin with clavulanic acid; CAZ: Cefazidime; CTX: Cefotaxime; ATM: Aztreonam; CRO: Ceftriaxone; MEM: Meropenem; IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem.

On the other hand, *P. agglomerans* presented sensitivity only to carbapenems (MEM, IMP, and ERT). Ruiz [37] and Borges *et al.* [38] also showed a high resistance profile in *P. agglomerans* isolated from hospital sewage and clinical, respectively. In contrast to our finding, Filho [39] related high rate of resistance to carbapenems in this species, including the ertapenem, imipenem and meropenem. Considering the clinical importance of *P. agglomerans*, studies on the susceptibility profile in this species is relevant and may help in choosing the best antimicrobial therapy.

Nevertheless, resistant *E. coli* to at least two beta-lactams (11/37; 29.7 %) and with decreased or intermediate susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (2/37; 5.4 %), cefotaxime (2/37; 5.4 %), ceftriaxone (1/37; 2.7 %) and imipenem (2/37; 2.7 %) were found. Carbapenems are the last generation of beta-lactam antimicrobials used to treat infections caused by Gram-negative bacteria resistant to penicillins, cephalosporins and other compounds of the same class [40]. According to Bessa *et al.* [41] high rates of *E. coli* resistant to different antimicrobials, among them imipenem, are not common in environments such as rivers, domestic sewage and sewage treatment plants. Thus, ours finding of decreased susceptibility imipenem among *E. coli* isolates from domestic sewage is of particular concern considering the possibility of exchange of bacteria between environmental and clinical settings, which may contribute to the spread and increase of carbapenem resistance [42].

In this context, resistance to carbapenems in enterobacteriales occurs mainly by hydrolytic action promoted by carbapenemases [15], and phenotypic tests have been widely used for detection these enzymes. It should be emphasized that the investigation of the production of carbapenemases is of great importance, since even in isolates considered sensitive to carbapenems, it is possible to harbor the genes coding for this enzyme [43]. Here, using the modified Hodge test (MHT) and inactivation of carbapenems mCIM and eCIM methods, none isolated was carbapenemase-positive. It may be suggested that there is a low prevalence of microorganisms producing carbapenemases in domestic sewage environments in region studied. In fact, Conte *et al.* [44] did not detect the *bla* gene in *E. coli*, *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* recovered from hospital sewage and domestic or industrial sanitary effluent from Curitiba-PR. However, the finding of *E. coli* with decreased susceptibility to imipenem alerts to the possibility of the presence of non-enzymatic mechanisms of resistance to carbapenems circulating in the investigated environment, such as overexpression

of efflux pumps (e.g., AdeABC), penicillin-binding protein alterations, or loss of outer membrane protein (e.g., CarO) [45].

In contrast to the carbapenemases, the phenotypic assay has revealed considerable prevalence of ESBL-producer isolates, which were mostly identified as *E. coli* (10/45; 22.2%) (figure 1). Phenotypic test for ESBL detection has not been validated by CLSI [23] for *P. agglomerans*. But, here, these species presented a test result that would be compatible with the producer interpretation of this beta-lactamase [46, 47]. ESBL-producing strains are capable of hydrolyzing penicillins, broad-spectrum cephalosporins and monobactams [3], which limit considerable the therapeutic options available to, basically, the carbapenems and polymyxins. Korzeniewska & Harnisz [30] found similar results in *E. coli* isolates from municipal sewage samples, but other ESBL-positive enterobacteriales, including the genera *Citrobacter* and *Klebsiella*, were also reported. In addition, according to Mesa *et al.* [48], all *E. coli* (32) recovered from five domestic sewage samples were ESBL producers. However, it should be considered that the present study was conducted in a single sample of domestic sewage, what could explain the greater diversity of enterobacteriales found in other studies as well as the higher rate of ESBL-positive *E. coli* detected.

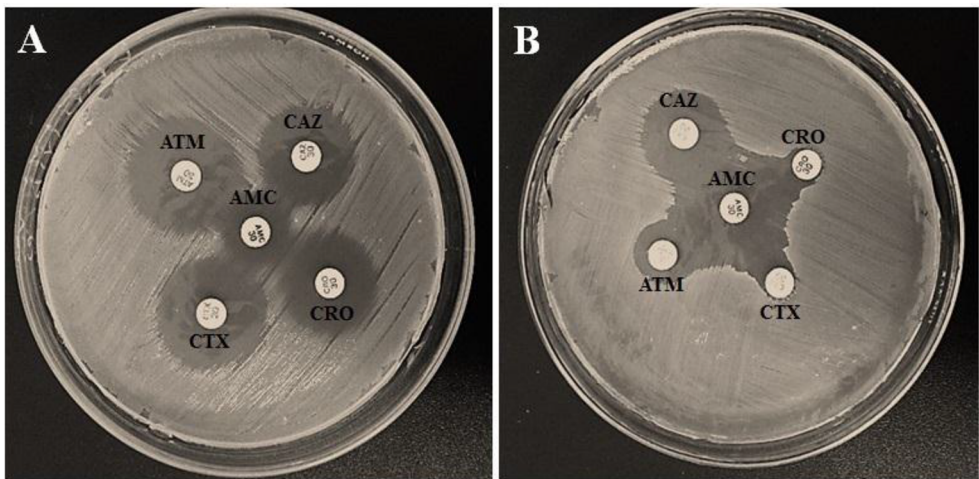


Figure 1. Phenotypic disk approximation test according to CLSI 2017. A) ESBL-Negative test. B) ESBL-positive test. CAZ: Ceftazidime; CTX: Cefotaxime; ATM: Aztreonam; CRO: Ceftriaxone.

Most ampicillin-resistant *E. coli* were carbapenemase and ESBL-negative and sensitive to the antimicrobials aztreonam, ceftazidime, amoxicillin/clavulanic acid, ceftriaxone, cefotaxime and carbapenems. Thus, possibly mechanisms of resistance to ampicillin other than enzymatic inactivation circulate among the species of the studied environment, including target modification, change in efflux pump and external mem-

brane permeability [5]. In this study, only the production of inactivating enzymes was investigated, and the evaluation of other resistance determinants thought of different phenotypic and genotypic methodologies are needed to elucidate the mechanisms of resistance to ampicillin presented by these isolates.

CONCLUSION

Ampicillin-resistant and ESBL-producing enterobacteriales (mainly *E. coli*) were recovered from the urban raw sewage and analyzed. Thus, we showed that the domestic sewage is an important source of AMR determinants in medium-sized cities from southeast Brazil. Furthermore, the absence of detection of beta-lactam hydrolytic enzymes (i.e., ESBL and carbapenemases) in many cases, suggests that possibly the mechanism of bacterial resistance to beta-lactams in this environment is non-enzymatic and specific for ampicillin. Despite the ampicillin-resistant, the sensitivity to others beta-lactam antibiotics (e.g., carbapenems) was high, suggesting that these compounds remain as good therapeutic option against microbial population of region. The results showed here not only reinforce the importance of surveillance to improve antibiotic resistance control, but also help to predict the profile of resistance in clinical, since that is well documented the strong relationship between clinical and environmental resistance pattern.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the University of São João del-Rei for its support during the research. W.G.L. is grateful to *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior* (Capes) for a Ph.D. fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have reported no conflicts of interest.

REFERENCES

1. M. Adeolu, S. Alnajjar, S. Naushad, S.R Gupta, Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae

- fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. Nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**(12), 5575-5599 (2016).
2. T.P. Gomes-Chagas, *Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro*, Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011, 147 p.
 3. J.D. Pitout, K.B. Laupland, Extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern, *Lancet Infect. Dis.*, **8**(3), 159-166 (2008).
 4. J.D. Pitout, P. Nordmann, K.B. Laupland, L. Poirel, Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community, *J. Antimicrob. Chemother.* **56**(1), 52-59 (2005).
 5. D.O. Guimarães, L.S. Momesso, M.T. Pupo, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Quim. Nova.* **33**(3), 667-679 (2010).
 6. A.P. P. Cione, M.J. Liberale, P.M. Silva, Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de associação de ampicilinas em pó liofilizado para injeção, *Quim. Nova.* **33**(1), 200-207 (2010).
 7. M.A.S. Junior, E.S. Ferreira, G.C. Conceição, Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico, *NewsLab*, **63**, 152-174 (2004).
 8. Z.D. Pana, T. Zaoutis, Treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLs) infections: what have we learned until now? *F1000Res.*, **29**, 1347 (2018).
 9. Y. Doi, A. Iovleva, R.A. Bonomo, The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world, *J. Travel. Med.*, **24**(Suppl. 1), S44-S51 (2017).
 10. A. Brolund, Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective, *Infect. Ecol. Epidemiol.*, **4**, 24555 (2014).
 11. S. Ghafourian, N. Sadeghifard, S. Soheili, Z. Sekawi, Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **17**, 11-21 (2015).

12. K. Bush, Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae, *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 558-564 (2010).
13. D.B. Fuentefria, A.E. Ferreira, G. Corção, Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related?. *J. Environ. Manage.*, **92**, 250-255 (2011).
14. S. Tschudin-Sutter, J.C. Lucet, N.T. Mutters, E. Tacconelli, J.R. Zahar, S. Harbarth, Contact precautions for preventing nosocomial transmission of extended-spectrum β lactamase-producing *Escherichia coli*: A point/counterpoint review, *Clin. Infect. Dis.*, **65**, 342-347 (2017).
15. F. Codjoe, E. Donkor, Carbapenem resistance: A review, *Med. Sci.*, **6**(1), 1 (2017).
16. K. Bush, The ABCD's of β -lactamase nomenclature, *J. Infect. Chemother.*, **19**, 549-59 (2013).
17. G. Patel, R.A. Bonomo, Stormy waters ahead: global emergence of carbapenemases, *Front. Microb.*, **4**, 1-17 (2013).
18. L.K. Logan, R.A. Weinstein, The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace, *J. Infect. Dis.*, **215**(Suppl. 1), S28-S36 (2017).
19. E. Falqueto, D.C. Kligerman, Diretrizes para um programa de recolhimento de medicamentos vencidos no Brasil, *Ciência & Saúde Coletiva*, **18**, 883-892 (2013).
20. M.H.M. Menezes, A.L.V. Santos, Descarte de medicamentos vencidos em drogarias do centro de barra do garças, *Revista Univar.*, **1**, 164-169 (2016).
21. K. Kümmerer, A. Henninger, Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent, *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**, 1203-1214 (2003).
22. L.G. Oliveira, L.G.R. Ferreira, A.M.A. Nascimento, M.P. Reis, M.F. Dias, W.G. Lima, M.C. Paiva, Antibiotic resistance profile and occurrence of AmpC between *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a domestic full-scale WWTP in southeast Brazil, *Water Sci. Technol.*, **1**, 108-114 (2017).
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, CLSI Twelfth two Edition, M02-A2, 2017.

24. W.C. Winn, S.D. Allen, W.M. Janda, E.W. Koneman, G.W. Procop, P.C. Schreckenberger, G.L. Woods, *Koneman, diagnóstico microbiológico: Texto e atlas colorido*, 6ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
25. F. Pasteran, L.J. Gonzalez, E. Albornoz, G. Bahr, A.J. Vila, A. Corso, Triton hodge test: improved protocol for modified hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers, *J. Clin. Microb.*, **54**, 640-649 (2016).
26. I.D. Rafráf, I. Lekunberri, A. Sánchez-Melsiá, M. Aouni, C.M. Borrego, J.L. Balcázar, Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia, *Environ. Pollution*, **219**, 353-358 (2016).
27. R.S. Hendriksen, P. Munk, P. Njage, B. van Bunnik, L. McNally, O. Lukjanenko, *et al.*, Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage, *Nat. Commun.*, **10**(1), 1124 (2019).
28. J.J. Huang, H.Y. Hu, S.Q. Lu, Y. Li, F. Tang, Y. Lu, B. Wei, Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China, *Environm. Internat.*, **42**, 31-36 (2012).
29. H. Wilson, M.E. Torok, Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Microb. Genomics*, **4**, 1-14 (2018).
30. E. Korzeniewska, M. Harnisz, Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment, *J. Environm. Managem.*, **128**, 904-911 (2013).
31. M. Haque, M. Sartelli, J. McKimm, M.A. Bakar, Health care-associated infections-an overview, *Infect. Drug Resist.*, **11**, 2321-2333 (2018).
32. M.E. Terlizzi, G. Gribaudo, M.E. Maffei, Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies, *Front. Microbiol.*, **8**, 1566 (2017)
33. A. Cheng, C.Y. Liu, H.Y. Tsai, M.S. Hsu, C.J. Yang, T. Huang, C.H. Liao, P.R. Hsueh, Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* at a medical center in Taiwan, 2000–2010, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **46**(3), 187-194 (2013).
34. J. Dutkiewicz, B. Mackiewicz, M.K. Lemieszek, G.M. Marcin, J. Milanowski, *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants, *Ann. Agricult. Environm. Med.*, **23**, 197-205 (2016).

35. D.V. Oliveira, *Avaliação do perfil de Resistencia a antimicrobianos de bacterias Gram-negativas isoladas nas águas do arroia dilúvio*, Dissertação (pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2011, 84 p.
36. R.Y. Castañeda, P.L. Guaimacuto, R.Y. Figueroa, Z.J.L. Fuentes, Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla de margarita, Venezuela, *Saber Universidad de Oriente*, **21**, 12-19 (2009).
37. L.G.P. Ruiz, *Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M e blaGES em Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista*, Dissertação (mestrado em microbiologia), Universidade estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campos de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2010, 92 p.
38. A.A. Borges, L.G. Magalhães, A.P.L. Jabur, A.M. Cardoso, Infecção urinária em gestantes atendidas em um laboratório clínico de Goiânia-GO entre 2012 e 2013, *Estudos Goiânia*, **41**, 637-648 (2014).
39. H. Rodrigues-Pereira Filho, *Frequência e perfil de susceptibilidade a antibióticos de bactérias isoladas em uroculturas*, Monografia (conclusão do componente curricular), Universidade federal da Bahia, Salvador, 2013, 57 p.
40. K. Bush, P.A. Bradford, β -Lactams and β -lactamase inhibitors: An overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**(8), a025247 (2016).
41. L.J. Bessa, A. Barbosa-Vasconcelos, A. Mendes, P. Vaz-Pires, P. Martins da Costa, High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and Enterococcus spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, **12**, 426-435 (2014).
42. Y.K. Kwak, P. Colque, S. Byfors, C.G. Giske, R. Möllby, I. Kühn, Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *Int. J. Antimicrob. Agents*, **45**, 25-32 (2015).
43. L.P. Almeida, F.P. de Carvalho, A.G. Marques, A.S. Pereira, R.P. Bortoleto, M.D.V. Martino, Desempenho do disco de ertapenem como preditor da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por bacilos Gram-negativos isolados de culturas em um hospital municipal de São Paulo, *Einstein*, São Paulo, **10**, 439-441 (2012).

44. D. Conte, J.K. Palmeiro, K. da Silva-Nogueira, T.M. de Lima, M.A. Cardoso, R. Pontarolo, F.L. Degaut-Pontes, L.M. Dalla-Costa, Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **136**, 62-69 (2017).
45. W.G. Lima, G.C. Silva-Alves, C. Sanches, S.O. Antunes-Fernandes, M.C. de Paiva, Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injury: A systematic review and meta-analysis, *Burns*, **45**, 1495-1508 (2019).
46. R.C.G. Silva, A.C.O. Silva, S.R. Oliveira, Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **50**, 421-427 (2014).
47. A. Lago, S.R. Fuentefria, D.B. Fuentefria, Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, *Revista Soc. Bras. Med. Trop.*, **43**, 430-434 (2010).
48. R.J. Mesa, V. Blanc, A.R. Blanch, P. Cortés, J.J. González, S. Lavilla, E. Miró, M. Muniesa, M. Saco, T. Tórtola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats, F. Navarro, Extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage), *J. Antimicrob. Chemother.*, **58**, 211-215 (2006).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

N.T. Alves-Coelho, R. Salviano da Silva, G. Morais-Delmondes, W.G. Lima, C.E. de Matos Jensen, M.C. de Paiva, Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 708-725 (2021).

Metabolitos bioactivos y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial extraído de dos especies del género *Tagetes*

Rosa Huaraca Aparco^{1*}, María del Carmen Delgado Laime², Fidelia Tapia Tadeo³

Universidad Nacional José María Arguedas, Andahuaylas, Perú.

Correos electrónicos:

^{1*} Autora de correspondencia: rhuaraca@unajma.edu.pe

² mcdelgado@unajma.edu.pe

³ ftapia@unajma.edu.pe

Recibido: 11 de febrero de 2021

Revisado: 25 de marzo de 2021

Aceptado: 30 de marzo de 2021

RESUMEN

Objetivo: este estudio investigó los metabolitos bioactivos y actividad antioxidante de aceites esenciales de dos especies del género *Tagetes*. **Método:** el aceite esencial se obtuvo por arrastre a vapor de agua, posteriormente se determinó su rendimiento de extracción, densidad relativa, índice de refracción y su solubilidad en etanol (70 % v/v). La composición química fue evaluada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La actividad antioxidante fue determinada mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y la capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS^{•+}. **Resultados:** en los aceites esenciales de las especies *Tagetes* se logró identificar 26 componentes químicos para la especie *Tagetes elliptica* Sm. y 16 para *Tagetes minuta* L., ambas especies presentaron como componentes principales a los monoterpenos (61 %) y sesquiterpenos (44 %). Los metabolitos bioactivos de aceites esenciales entre ambas especies de *Tagetes* fueron, β -trans-ocimeno (25,03 %), trans-tagetona (51,37 %), β -mirceno (2,78) y β -cariofileno (1,17 %). Los rendimientos de extracción oscilaron entre 0,05 y 0,048 %, la densidad entre 0,90 y 0,88 (g/ml) con un índice de refracción de 1,493 y 1,482 y una solubilidad (v/v) positiva entre ambas especies. La actividad antioxidante del aceite esencial en ambas especies mostró una variación entre 1,77 y 2,56 mg/mL para el DPPH y 21,02 a 41,06 mg/mL para ABTS^{•+}. **Conclusión:** los aceites esenciales de las especies *Tagetes elliptica* Sm.

y *Tagetes minuta* L. son una fuente de metabolitos bioactivos fomentan potencialidades antimicrobianas y antioxidantes con fines de su uso como conservantes alimentarios.

Palabras clave: Cromatografía, densidad, monoterpenos, sesquiterpenos, solubilidad.

SUMMARY

Bioactive metabolites and *in vitro* antioxidant activity of essential oil extracted from two species of the genus *Tagetes*

Aim: This study investigated the bioactive metabolites and antioxidant activity of essential oils of two species of the genus *Tagetes*. **Method:** The essential oil was obtained by steam stripping, its extraction performance, relative density, refractive index and its solubility in ethanol (70 % v/v) were subsequently determined. The chemical composition was tested using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activity was determined using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) free radical method and the ABTS^{•+} radical cation trapping capacity. **Results:** In the essential oils of the *Tagetes* species, it was found to identify 26 chemical components for the species *Tagetes elliptica* Sm. And 16 for *Tagetes minuta* L., both species presented monoterpenes (61 %) and sesquiterpenes (44 %) as main components. The bioactive metabolites of essential oils between both species of *Tagetes* were, β -trans-ocimeno (25.03 %), trans-tagetone (51.37 %), β -myrcene (2.78) and β -caryophyllene (1.17 %). The extraction yields ranged between 0.05 and 0.048 %, the density between 0.90 and 0.88 (g/ml) with a refractive index of 1.493 and 1.482 and a positive solubility (v/v) between both species. The antioxidant activity of the essential oil in both species showed a variation between 1.77 and 2.56 mg/mL for DPPH and 21.02 to 41.06 mg/mL for ABTS^{•+}. **Conclusion:** The essential oils of the species *Tagetes elliptica* Sm. and *Tagetes minuta* L. are a source of bioactive metabolites that promote antimicrobial and antioxidant potentialities for use as food preservatives.

Keywords: Chromatography, density, monoterpenes, sesquiterpenes, solubility.

RESUMO

Metabólitos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial extraído de duas espécies do gênero *Tagetes*

Objetivo: este estudo investigou os metabólitos bioativos e a atividade antioxidante de óleos essenciais de duas espécies do gênero *Tagetes*. **Método:** o óleo essencial foi obtido por decapagem a vapor, posteriormente foram determinados seu desempenho de extração, densidade relativa, índice de refração e sua solubilidade em etanol (70% v/v). A composição química foi trabalhada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A atividade antioxidante foi determinada pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidracila (DPPH) e pela capacidade de captura do cátion radical $ABTS^+$. **Resultados:** nos óleos essenciais das espécies *Tagetes*, identificou-se 26 componentes químicos para a espécie *Tagetes elliptica* Sm. E 16 para *Tagetes minuta* L., ambas as espécies apresentaram monoterpenos (61%) e sesquiterpenos (44%) como principais componentes. Os metabólitos bioativos dos óleos essenciais entre as duas espécies de *Tagetes* foram, β -trans-ocimeno (25,03%), trans-tagetona (51,37%), β -mirceno (2,78) e β -cariofileno (1,17%). Os rendimentos de extração variaram entre 0,05 e 0,048%, a densidade entre 0,90 e 0,88 (g/ml) com índice de refração de 1,493 e 1,482 e solubilidade positiva (v/v) entre as duas espécies. A atividade antioxidante do óleo essencial em ambas as espécies apresentou variação entre 1,77 e 2,56 mg/mL para DPPH e 21,02 a 41,06 mg/mL para BTS^+ . **Conclusão:** os óleos essenciais das espécies *Tagetes elliptica* Sm. e *Tagetes minuta* L. são uma fonte de metabólitos bioativos, atualmente com potencial antimicrobiano e antioxidante com a finalidade de serem conservantes de alimentos.

Palavras-chave: Cromatografia, densidade, monoterpenos, sesquiterpenos, solubilidade.

INTRODUCCIÓN

Perú es uno de los 12 países con la mayor diversidad biológica, con aproximadamente 10 % de flora mundial, estimada en 25 000 especies, 30 de ellas son endémicas [1]. Existe un interés creciente en compuestos bioactivos y las propiedades antioxidantes de sustancias de fuentes naturales que potencialmente pueden ser utilizadas en las industrias alimentarias. Se sabe que los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales poseen actividad biológica [2, 3]. Los aceites esenciales son productos vegetales naturales que contienen una mezcla compleja por tanto tienen múltiples propiedades antimicrobianas [4]. Siendo los constituyentes de los grupos de materias primas más importantes para la industria alimentaria, farmacéutica, de perfumería y afines [5]. La

mayoría de estos compuestos se derivan de terpenoides oxigenados, particularmente terpenos fenólicos, fenilpropanoides y alcoholes [6, 7]. Las especies de *Tagetes* se utilizaron originalmente como fuente de aceites esenciales que eran extraídas de hojas, tallos y flores, aplicándose como aromatizantes en la industria alimentaria, además sus pigmentos tienen potencial como colorante alimentario natural.

Tagetes es un género importante perteneciente a la familia Asteraceae [8], aromático, originario de Centro y Sudamérica con una distribución cosmopolita debido a actividades antrópicas [9]. *Tagetes minuta* L. es una planta aromática con amplio espectro de actividad biológica que posee propiedades medicinales, antioxidantes y antimicrobianas [10]. La gran importancia de *Tagetes* se debe a la presencia de aceite esencial en casi todas las partes de sus plantas, excepto en el tallo [11]. Además, presenta actividades biológicas como actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, anticancerosas, acaricidas, nematocidas, insecticidas y alelopáticas [12]. El creciente interés en las industrias de la alimentación, el sabor, la perfumería contribuye a la investigación de las condiciones ambientales afectan su composición cualitativa y rendimiento [13].

Tagetes minuta L. es conocido con el nombre común de *huacatay* en Perú, en México se le conoce como caléndula mexicana. Es una especie que acumula una larga historia mundial de usos tales como alimentos, terapéuticos y aromaterapia que son inherentes a los químicos tagetonas y ocimenonas (E y Z) único de la planta su composición y bioactividades. De acuerdo con la revisión de antecedentes investigativos, acerca de metabolitos bioactivos y actividad antioxidantes de las especies aromáticas *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm., no se reportan publicaciones en nuestro país, sin embargo, existen informes sobre aceites esenciales de estas especies en otros países.

A pesar de su importancia como especies alimentarias, las investigaciones en especies *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. relacionadas con su composición química, diversidad genética y propiedades biológicas son limitadas. Por lo tanto, el objetivo fue determinar las propiedades físicas e identificar los metabolitos bioactivos y actividad antioxidante de los aceites esenciales de ambas especies del género *Tagetes* que crecen en forma silvestre y están adaptadas a ecosistemas de moderada altitud de la región andina del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia vegetal e identificación botánica

Se utilizaron las hojas de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. recolectadas de la zona alto andina del distrito de José María Arguedas (13°42 S.73°24 O a una altitud de 2935 m s.n.m.) perteneciente a la provincia de Andahuaylas, región Apurímac. Con

clima Cwd de acuerdo con Koppens, con precipitaciones media anual alrededor de 1000 mm/año, humedad relativa media de 50 % y temperatura de -5 °C a 21 °C, con moderada incidencia de heladas. Las hojas de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. fueron recolectadas durante los meses de febrero a marzo del 2019. Las plantas fueron identificadas, autenticadas y depositadas en el laboratorio de botánica del pabellón de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional José María Arguedas.

Extracción de aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales se seleccionaron las hojas frescas de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm.; se utilizaron 2,5 kilogramos de hojas frescas de cada especie y se sometieron a extracción mediante destilación por arrastre a vapor de agua a una presión de 10 PSI. Una vez destilado los aceites esenciales se separaron por diferencia de densidades utilizando un decantador florentino graduado. Luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de realizar análisis, los rendimientos de extracción se evaluaron según la ecuación 1.

$$\%P = \frac{\text{Masa final de aceite esencial (g)}}{\text{Masa inicial de muestra o follaje (g)}} * 100 \quad (1)$$

Determinación de propiedades físicas del aceite esencial

En los aceites esenciales obtenidos de cada especie se determinaron: la densidad relativa a 20 °C de acuerdo con la norma técnica peruana: NTP 3129.081:1974; índice de refracción en refractómetro ABBE; rotación óptica en polarímetro y solubilidad en etanol. Para este último se empleó una solución al 70 % tomando 100 µL de aceite esencial.

Determinación de compuestos químicos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de la composición química de los aceites esenciales fue identificado mediante Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en el centro de investigación de productos naturales de la Universidad Peruano Cayetano Heredia.

Para el análisis de cada muestra se utilizó 20 µL de aceite esencial en 980 µL de diclorometano, que se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas. Se separaron los compuestos en una mezcla mediante una columna capilar apolar DB-5MS (60 m x 250 µm x 0,25 µm) (J y W Scientific de 5 % fenil-polimetilsiloxano).

La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C con una inyección en modo Split (50:1), la programación de temperatura del horno fue: temperatura inicial 50 °C, mantenida por 5 min; posteriormente incrementándose a 10 °C/min hasta alcanzar 100 °C

y finalmente a 10 °C/min hasta 270 °C, manteniéndose temperatura final por 1 min. El tiempo de corrida fue de 77,8 min, se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo constante de 1mL/min. Los compuestos de los aceites de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. fueron identificados utilizando el *software* proporcionado por Agilent; MSD chemstation (version EO2.00.493), Por comparación de los espectros de masas de cada pico con los de la librería de espectros de masas de las bases de datos de flavor y del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, 08).

Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales

Para la determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies del género *Tagetes* se emplearon dos metodologías:

Método del radical DPPH

Se prepararon diluciones en etanol acuoso de extractos hidroalcohólicos hasta obtener concentraciones de 0,0 a 150, 0 µg/mL. Se combinaron 1,0 mL de cada dilución con 0,5 mL de una solución de 0,3 mM de DPPH en etanol dejándose reaccionar a temperatura ambiente por 30 min, posteriormente se llevó a medir la absorbancia de las mezclas a 517 nm en el equipo de espectrofotometría. El porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación 2:

$$\text{Actividad antioxidante}(\%) = \frac{AC - AM - AB}{AC} \times 100 \quad (2)$$

AM: es la absorbancia de la muestra +DPPH, AB: es la absorbancia del blanco (muestra +etanol) y AC: es la absorbancia del blanco del reactivo (DPPH+etanol)

La concentración del extracto hidroalcohólico se neutralizó al 50 por ciento de los radicales de DPPH (EC₅₀, concentración efectiva media) y se obtuvo directamente al graficar la recta entre el porcentaje de actividad antioxidante, frente a la concentración de la muestra de los aceites esenciales mg/mL.

*Método del radical BTS**

La actividad captadora de radical libre ABTS⁺ se determinó a través del método desarrollado por Re *et al.*, con algunas modificaciones.

3,5 mM de ABTS reaccionaron con 1,25 mM de persulfato de potasio. Las muestras se incubaron a temperaturas de 2-8 °C durante 16-24 h. en oscuridad. El radical BTS^{**} formado se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0,7+menos 0,05 a 734 nm. A un volumen de 190 µL de dilución del radical BTS^{**} se agregó 10 µL de la

muestra de AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Pasado el tiempo se determinó mediante el equipo espectrofotómetro a 734 nm en el lector de microplacas Themoscintific. Para el control positivo de captación de los radicales BTS** se utilizó ácido ascórbico (4 µg/mL).

Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado, para la evaluación estadística se utilizó el diseño completamente al azar (DCA); el análisis de varianza se trabajó con 0,05 de significancia; al encontrar diferencia significativa se procedió a realizar la prueba de comparaciones de medias de Fisher (LSD) a un nivel de $\alpha=0,05$. Los datos fueron procesados con la ayuda de los programas estadísticos Centurión XVII y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2016.

RESULTADOS

Rendimiento y propiedades físicas de los aceites esenciales

La determinación de las propiedades fisicoquímicas nos permite conocer la calidad y el control de pureza en los aceites esenciales.

De acuerdo con la tabla 1 se muestra el porcentaje de rendimiento de extracción y las propiedades físicas de aceites esenciales de ambas especies del género *Tagetes*.

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas de los aceites esenciales de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm.

Análisis	<i>Tagetes minuta</i> L.	<i>Tagetes elliptica</i> Sm.
Rendimiento	0,05± 0,002 ^a	0,048± 0,001 ^a
Densidad(g/ml) a 24 °C	0,900 ±0,0004 ^a	0,882± 0,0043 ^b
Índice de refracción a 24 °C	1,493± 0,05 ^a	1,482± 0,04 ^a
Solubilidad EtOH 70 % (v/v)	Positiva	Positiva
Gravedad específica a 20 °C	0,872 ^a ± 0,01	0,945± 0,034 ^b

Valores con diferentes letras (a, b) dentro de cada columna denotan significancia en la prueba de Tukey, con $\alpha=5\%$

Composición química de los aceites esenciales de dos especies del género *Tagetes*

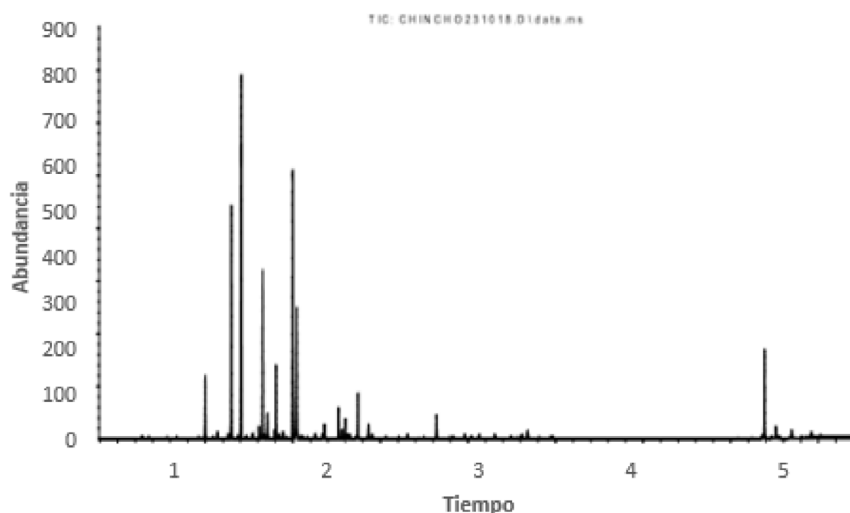
Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de ambas especies del género *Tagetes* se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes mayoritarios detectados en los aceites esenciales de *Tagetes minuta* L y *Tagetes elliptica* Sm.

Compuesto	Porcentaje de abundancia relativa (TR %)	
	<i>Tagetes minuta</i> L.	<i>Tagetes elliptica</i> Sm.
β -trans-Ocimeno	21,07 (25,03)	16,5 (11,45)
β -Mirceno	NP	15,01 (2,78)
β -Linalol	NP	18,56 (1,18)
Cis-Tagetona	25,6 (3,5)	20 (16, 27)
m-tert-butil-fenol	NP	22,6 (1,44)
Trans-Tagetona	25,94 (51,37)	20,22 (10,25)
β -Cariofileno	36,39 (0,48)	28,21 (1,17)
Guaiol	41,96 (1,25)	NP
Apiol	42,45 (3,28)	33,41 (0,43)
α -Bisabolol	44,29 (1,1)	NP

Tiempo de retención (TR) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, no presente (NP).

En el análisis de la composición química se detectaron y cuantificaron un total 26 compuestos químicos en el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm con fracción principal en monoterpenos en (61,00 %) y 16 compuestos químicos para el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. encontrándose como fracción principal a los monoterpenos (50,0 %), entre ambas especies se obtuvo una desviación estándar por debajo del 5 % entre los porcentajes de cada analito en ambas columnas utilizadas. Se identificaron como metabolitos bioactivos en los aceites esenciales en las especies del género *Tagetes* al β -trans-Ocimeno, Trans-Tagetona, Cis-Tagetona, β -Mirceno y β -Cariofileno.

**Figura 1.** Cromatograma del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm.

Actividad antioxidante de AE de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm

En la tabla 3. Se muestra los resultados de actividad antioxidante en los aceites esenciales de ambas especies del género *Tagetes*, mediante los métodos de DPPH y ABTS.

Tabla 3. Actividad antioxidante mediante métodos DPPH y ABTS.

Aceite esencial	Métodos	
	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Tagetes minuta</i> L.	1,77±0,02	21,02±0,14
<i>Tagetes elliptica</i> Sm.	2,56±0,12	41,06±0,23

Se encontró diferencias significativas en la actividad antioxidante de ambas muestras de *Tagetes* como se muestra en la tabla 3. De acuerdo con la metodología de DPPH el IC₅₀ vario de 1,77 mg/mL a 2,56 mg/mL, sin embargo, el IC₅₀ de BTS** varió de 21,02 a 41,06 mg/mL, se encontró una actividad antioxidante más alta: IC₅₀ 41,06 mg/mL. El aceite esencial de *Tagetes minuta* presento una IC₅₀ más bajo 1,77 mg/mL, respectivamente exhibió una considerable actividad de eliminación de radicales DPPH en comparación con el método de BTS**.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de rendimiento. El rendimiento del aceite esencial depende de la planta y el distrito donde se cultiva [14]. De acuerdo con los resultados de propiedades físicas del aceite esencial, la densidad presento una variación para ambas especies del género *Tagetes*, sin embargo, el índice de refracción no presentó una variación entre ambas especies. La presencia de un valor menor del índice de refracción y densidad está relacionada con la cantidad de fenoles [15].

El índice de refracción de ambas especies presentó valores elevados, que indican presencia de compuestos de alto peso molecular tales como sesquiterpenos y diterpenos y eventualmente oleorresinas en concentraciones altas [16], así mismo, el aceite esencial es de mayor calidad y pureza [17].

De acuerdo con los resultados de gravedad específica de los aceites esenciales de ambas especies se encontró diferencias significativas con presencia a mayor calidad (0,945±0,034) en el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm. se encontraron valores similares a los reportados en otros estudios [18].

El análisis de los componentes químicos en los aceites esenciales de las especies *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm. mostraron mayormente la presencia de los siguientes compuestos: Trans-Tagetona, β -trans-Ocimeno, Cis-Tagetona, β -Cariofileno y Apiol.

Los aceites esenciales de la especie *Tagetes spp.* son ricos en hidrocarburos monoterpenicos (Ocimenos, limoneno, terpineno, mirceno y cetonas monoterpenicas aciclicas (tagetona, dihidrotagetona, y tagetenona) que son los odorates primarios además de cantidades menores de hidrocarburos sesquiterpenicos compuestos oxigenados [19].

De acuerdo con los resultados del estudio en especies de *Tagetes patula* se encontró una fuerte bioactividad en sus aceites esenciales contra los organismos patógenos de ensayo, lo cual se atribuye a la presencia de terpinoleno, E-cariofeno, Z-tagetona, E-tagetona, óxido de cariofeno, germacreno D.

En cuanto a sus bioactividades de la familia de especies del género *Tagetes* se encontró una actividad antibacteriana de fuerte a leve contra cepas de bacterias gran-positivas y gran-negativas probadas en el estudio [4].

En cuanto a las aplicaciones del aceite esencial, se encontró que los metabolitos sintetizados por las plantas del género *Tagetes* muestran efectos significativos como antioxidantes, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias toxicas y pigmentos. Se cree que la actividad de los metabolitos secundarios en las especies del género *Tagetes* está relacionado con su composición, concentración y condiciones ambientales que afectan su contenido.

Los aceites esenciales obtenidos de las diferentes partes de la planta pueden mostrar diferentes capacidades biológicas y por lo tanto pueden usarse en una variedad de industrias incluida la cosmética, farmacéutica o la producción de alimentos [20].

De acuerdo con Gakuubi [21] se reportó actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Tagetes minuta* L. contra bacterias fitopatógenas, *Pseudomonas savastanoi* pv, *Phaseoli axonopodis* pv que son responsables de las diferentes enfermedades de las plantas como antracnosis, tizón y *Ralstonia solanacearum*.

Los resultados indicaron que *Tagetes spp.* desempeña un papel importante en la preparación y conservación de alimentos, así como para su uso como una excelente especie para alimentos. Incluso desde un punto de vista tradicional, la naturaleza de *Tagetes spp.* y su composición afecta la cantidad y calidad de los extractos [22]. A pesar de los prometedores resultados obtenidos *in vitro*, estudios más detallados de los mecanismos de acción de los extractos y aceites esenciales de *Tagetes spp.* serían beneficiosos para alcanzar su potencial en biotecnología. Se documentó que los componentes de aceites esenciales, especialmente los terpenoides como los dihidrotagetonos, tagetonas y ocimenonas,

son suficientes para explicar la actividad antimicrobiana observada [23]. La diferencia en la actividad antioxidante entre ambas muestras podría atribuirse a la presencia de los monoterpenos en sus compuestos polifenólicos, los monoterpenos oxigenados conducen a actividades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas más altas [24-26].

CONCLUSIONES

En el estudio se logró determinar los metabolitos bioactivos de los aceites esenciales de las especies de *Tagetes minuta* L. y *Tagetes elliptica* Sm., se encontraron los metabolitos bioactivos: β -trans-Ocimeno, Trans-Tagetona, Cis-Tagetona, β -Mirceno y β -Cariofileno. Los monoterpenos acíclicos son, con efectos significativos como antioxidantes, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias tóxicas y pigmentos beneficiosos para alcanzar su potencial en biotecnología. La abundancia en monoterpenos conducen a actividades antioxidantes, en el estudio se encontró mayor presencia de antioxidantes en la especie de *Tagetes elliptica* L. Las propiedades físicas de ambas especies del género *Tagetes* estaban en los rangos de calidad para aceites esenciales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al laboratorio de Investigación de productos naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y a la Universidad Nacional José María Arguedas.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. P. Vásquez-Ocmín, S. Cojean, E. Rengifo, S. Suyyagh-Albouz, C.A. Amasifuen-Guerra, S. Pomel, B. Cabanillas, K. Mejía, P.M. Loiseau, B. Figadère, A. Maciuk, Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru), *J. Ethnopharmacol.*, **210**, 372-385 (2018).
2. A. Chrysargyris, M. Mikallou, S. Petropoulos, N. Tzortzakis, Profiling of essential oils components and polyphenols for their antioxidant activity of medicinal and aromatic plants grown in different environmental conditions, *Agronomy*, **10**(5), 727 (2020).

3. M. Tajkarimi, S. Ibrahim, D. Cliver, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control*, **21**, 1199-1218 (2010).
4. A.A. Safar, A.O. Ghafoor, D. Dastan, Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Tagetes patula* L. essential oil raised in Erbil, Iraq, *J. Reports Pharm. Sci.*, **9**(1), 59-67 (2020).
5. G. Oliveira-Everton, R.J. Pereira-Araújo, A.B. da Silva dos Santos, P.V. Serra-Rosa, R.G. de Oliveira-Carvalho Junior, A.M. Teles, P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek Filho, Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais da Pimenta dioica L. (pimenta da Jamaica) e *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(3), 641-655 (2020).
6. I.H. Bassolé, H.R. Juliani, Essential oils in combination and their antimicrobial properties, *Molecules*, **17**(4), 3989-4006 (2012).
7. S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.*, **94**(3), 223-253 (2004).
8. M. Marotti, R. Piccaglia, B. Biavati, I. Marotti, Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species, *J. Essent. Oil Res.*, **16**, 440-444 (2004).
9. M.S. Ojeda, U.O. Torkel-Karlin, G.J. Martinez, Y. Massuh, S.F. Ocaño, L.E. Torres, A.G. Chavez, O. Arizio, A. Curioni, *Planta aromáticas y medicinales modelos para su domesticación, producción y usos sustentables*, Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2015.
10. C.M. Kyarimpa, S. Böhmendorfer, J. Wasswa, B.T. Kiremire, I.O. Ndiege, J.D. Kabasa, Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*, *Ind. Crops Prod.*, **62**, 400-404 (2014).
11. V. Singh, B. Singh, V.K. Kaul, Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in western Himalaya and North Indian plains, *Economic Botany*, **57**, 535-544 (2003).
12. M.M. Gakuubi, W. Wanzala, J.M. Wagacha, S.F. Dossaji, Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: a review, *Amer. J. Essent. Oil Nat. Prod.*, **4**, 27-36 (2016).
13. S. Walia, S. Mukhia, V. Bhatt, R. Kumar, R. Kumar, Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya, *Ind. Crops Prod.*, **150**, [112449](#) (2020).

14. V. Preedy, *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Academic Press-Elsevier, Amsterdam, 2016, 932 p.
15. K. Hüsnü, C. Başer, F. Demirci, Chemistry of essential oils, en: Ralf Günter Berger (editor), *Flavours and Fragrances, Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer-Verlag, Berlin, 2007, p. 43-86.
16. S. Simard, J.M. Hachey, G.J. Collin, The variations of essential oil composition during the extraction process. The case of *Thuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill., *J. Wood Chem. Technol.*, **8**, 561-573 (1988).
17. J.C. Chalchat, R.P. Garry, A. Muhayimana, Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: Chemical composition according to harvesting location, growth stage and part of plant extracted, *J. Essent. Oil Res.*, **7**(4), 375-386 (1995).
18. E.M. Castro-Alayo, S.G. Chávez-Quintana, E.A. Auquiñivín-Silva, A.B. Fernández-Jeri, O. Acha-De la Cruz, N. Rodríguez-Hamamura, G.I. Olivas-Orozco, D.R. Sepúlveda-Ahumada. Aceites esenciales de plantas nativas del Perú: Efecto del lugar de cultivo en las características fisicoquímicas y actividad antioxidante, *Scientia Agropecuaria*, **10**(4), 479-487 (2019).
19. B. Salehi, M. Valussi, M.F. Bezerra Morais-Braga, J.N. Pereira-Carneiro, A.L.A. Borges-Leal, H.D. Melo-Coutinho, S. Vitalini, D. Kregiel, H. Antolak, M. Sharifi-Rad, N.C. Cirone-Silva, Z. Yousaf, M. Martorell, M. Iriti, S. Carradori, J. Sharifi-Rad, *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity, *Molecules*, **23**(11), 2847, (2018).
20. D. Coelho dos Santos, L. Rodrigues-Schneider, A. Silva-Barboza, A. Diniz-Campos, R. Guerra-Lund, Systematic review and technological overview of the antimicrobial activity of *Tagetes minuta* and future perspectives, *J. Ethnopharmacol.*, **208**, 8-15 (2017)
21. M.M. Gakuubi, J.M. Wagacha, S.F. Dossaji, W. Wanzala, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected plant pathogenic bacteria, *Int. J. Microbiol.*, **2016**, 7352509 (2016).
22. W.W. Cornelius, W. Wycliffe, *Tagetes* (*Tagetes minuta*) oils, en: V.R. Preedy (editor), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Academic Press, 2016, p. 791-802.
23. F. Senatore, F. Napolitano, M.A.H. Mohamed, P.J.C. Harris, P.N.S. Minkeni, J. Henderson, Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition, *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 574-578 (2004).

24. M. Rostaei, S. Fallah, Z. Lorigooini, A. Abbasi Surki, Crop productivity and chemical compositions of black cumin essential oil in sole crop and intercropped with soybean under contrasting fertilization, *Ind. Crop Prod.*, **125**, 622-629 (2018).
25. F. Deba, T.D. Xuan, M. Yasuda, S. Tawata, Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*, *Food Control*, **19**, 346-352 (2008).
26. B. Tohidi, M. Rahimmalek, A. Arzani, Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran, *Food Chem.*, **220**, 153-161 (2017).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R. Huaraca-Aparco, M.d.C. Delgado-Laime, F. Tapia-Tadeo, Metabolitos bioactivos y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial extraído de dos especies del género *Tagetes*, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 726-739 (2021).

Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

John Alexander Torres Lemus^{1,2a}, Ángela Patricia Rojas Rojas^{1,2b}, Fabián López-Vallejo^{3c}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

² Grupo de Investigación Biología Celular y Autoinmunidad, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

Correos electrónicos:

^a joatorresle@unal.edu.co

^b aprojasr@unal.edu.co

^c fhlopezv@unal.edu.co

Recibido: 25 de noviembre de 2020

Revisado: 9 de abril de 2021

Aceptado: 13 de abril de 2021

RESUMEN

Introducción: la enfermedad de Chagas es endémica de las zonas tropicales de América Latina y presenta una importante prevalencia, sin embargo, existen pocos tratamientos disponibles en el mercado por lo que la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico que actúen en el parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad, es necesaria considerando las graves complicaciones. **Objetivo:** evaluar las potenciales proteínas blanco, disponibles en la base de datos de PDB considerando como parámetro inicial, la similitud con proteínas humanas e identificar potenciales inhibidores del blanco elegido por medio de acoplamiento molecular. **Metodología:** se realizó una evaluación de las proteínas del parásito por medio de alineamiento de secuencias y posteriormente un cribado virtual por acoplamiento molecular con bases de datos y recursos informáticos disponibles en el Centro de Cómputo Avanzado de la Universidad de Texas (TACC), y se evaluaron los mejores resultados en función de afinidad, farmacocinética y toxicidad. **Resultados:** el

blanco molecular elegido fue la dUTPasa. Posterior al cribado virtual se seleccionaron 12 moléculas que presentan potencial inhibidor de estas, la 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-il}pirimidin-2-amina es una de las moléculas con mejor perfil para convertirse en candidato en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Palabras claves: Cribado virtual, acoplamiento molecular, chagas, *T. cruzi* dUTPase. .

SUMMARY

Molecular docking of the *Trypanosoma cruzi* dUTPase for identification of inhibitors in Chagas disease treatment

Introduction: Chagas disease is endemic to the tropical areas of Latin America and has an important prevalence, however, there are few treatments available in the market, so the search for molecules with pharmacological potential that can act in the same way as the disease, it is necessary considering the serious complications.

Aim: to evaluate the possible target proteins available in the PDB database, considering the similarity with human proteins as an initial parameter and identify potential inhibitors of the chosen target using molecular docking. **Methodology:** an evaluation of the parasite proteins was carried out by means of sequence alignment and subsequently a virtual molecular coupling screening was performed with databases and computer resources available at Centro de Cómputo Avanzado de Universidad de Texas (TACC), and the best results were evaluated based on affinity, pharmacokinetics, and toxicity. **Results:** the molecular target chosen was the dUTPase. After virtual screening, 12 moles showing inhibitory potential were selected of these, 4- {3- [3- (trifluoromethyl) phenyl] isoxazole-5-yl} pyrimidine-2-amine is one of the molecules with the best profile to become a candidate in the treatment of Chagas disease.

Keywords: Virtual ribado, molecular docking, chagas disease, *T. cruzi* dUTPase.

RESUMO

Docking molecular da dUTPase do *Trypanosoma cruzi* para identificação de inibidores no tratamento da doença de Chagas

Introdução: a doença de Chagas é endêmica das áreas tropicais da América Latina e possui importante prevalência, porém, poucos são os tratamentos disponíveis no mercado, por isso a busca por moléculas com potencial farmacológico que possam

atuar da mesma forma que a doença, é necessário considerando as complicações graves. **Objetivo:** avaliar as possíveis proteínas-alvo disponíveis na base de dados do PDB, considerando a similaridade com proteínas humanas como parâmetro inicial e identificação de potenciais inibidores do alvo escolhido por meio de acoplamento molecular. **Metodologia:** uma avaliação das proteínas do parasita foi realizada por meio de alinhamento de seqüências e posteriormente foi realizada uma triagem de acoplamento molecular virtual com bancos de dados e recursos computacionais disponíveis no Centro de Cômputo Avanzado de Universidad de Texas (TACC), e os melhores resultados foram avaliados com base na afinidade, farmacocinética e toxicidade. **Resultados:** o alvo molecular escolhido foi a dUTPase. Após a triagem virtual, 12 moles mostrando potencial inibitório foram selecionados destes, 4- {3- [3- (trifluorometil) fenil] isoxazol-5-il} pirimidina-2-amina é uma das moléculas com o melhor perfil para se tornar um candidato no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Triagem virtual, docking molecular, doença de chagas, *T. cruzi* dUTPase.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es endémica de América Latina, donde afecta a 21 países y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas en el mundo [1]. La enfermedad es transmitida por la subfamilia *Triatominae* de la chinche, de la cual 123 especies son conocidas por ser vectores naturales del parásito. Además de esto, la enfermedad también se expande geográficamente debido a la migración del vector por el cambio climático y, sin embargo, las opciones de tratamiento siguen siendo limitadas e ineficaces [2, 3]. Estas consisten en dos fármacos utilizados desde la década de los 70, nifurtimox y benznidazol [4]; ambos se activan por medio de una nitrorreductasa tipo I dependiente de NADH localizada a nivel mitocondrial y se ha demostrado que la disminución de la actividad de esta enzima juega un papel importante en la resistencia a estos tratamientos [5]. Además de esto, Nifurtimox es un fármaco de estrecho margen terapéutico y el tratamiento puede presentar reacciones adversas tales como: neuropatía periférica y depresión de médula ósea que pueden ser severas y acompañarse de fiebre, inflamación ganglionar y edema que corresponden a síntomas de hipersensibilidad a antimicrobianos [6].

Existen diferentes proteínas del parásito que pueden ser blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En las últimas décadas se han estudiado diferentes rutas metabólicas del parásito que pueden ser moduladas para obtener resultados terapéuticos tales como las de la biosíntesis de

ergosterol y los sistemas enzimáticos redox [7]. También se han estudiado proteínas involucradas en la adhesión a las células del huésped como la transialidasa [8] y otras proteínas como la tripanotión reductasa y la superóxido dismutasa que actúan protegiendo al parásito del daño generado por las especies reactivas del oxígeno [9]. Sin embargo, no se han logrado descubrir ni diseñar inhibidores potentes de estas enzimas [8]. Estrategias adicionales se han usado para el descubrimiento de nuevos fármacos entre las que se incluye el modelado *in silico* de proteínas del parásito homólogas a proteínas de función conocida en otras especies [10], presentándose las desventajas derivadas de no disponerse de estructura cristalizada. También se han evaluado compuestos de actividad farmacológica conocida para inhibir rutas metabólicas específicas como la biosíntesis de ergosterol, la glucólisis, el metabolismo del pirofosfato, entre otras rutas [11]; así mismo, presentándose desventajas como la alta probabilidad de manifestación de eventos adversos, por lo tanto, la evaluación y aproximación a nuevos blancos moleculares resulta necesaria para el desarrollo de tratamientos adecuados.

La dUTPasa (desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa) es una enzima que cataliza la reacción de ruptura hidrolítica del dUTP (desoxi uridin trifosfato) generando pirofosfato y dUMP (desoxi uridin monofosfato) como productos. La función de esta enzima es necesaria para generar los sustratos de la timidilato sintasa que es la responsable de la síntesis de dTMP (desoxi timidin monofosfato) y por lo tanto está relacionada con el aporte del nucleótido timina para la síntesis del ADN. En organismos eucariotas existen vías adicionales para sintetizar los sustratos de la enzima timidilato sintasa, por lo que en estos organismos es de especial importancia una segunda función de la dUTPasa que consiste en mantener el dUTP en muy bajas cantidades evitando que este nucleótido se adicione equivocadamente al ADN. La ADN polimerasa no puede diferenciar entre el dUTP y el dTTP (desoxi timidin trifosfato), por esto, se necesita que la proporción de estos nucleótidos se encuentre en órdenes de $1:1 \times 10^5$, con el objetivo de que el sustrato principal en la síntesis del ADN sea el dTTP y no se adicione uracilo al ADN [12, 13]. Cuando la cantidad de dUTP aumenta se facilita el ingreso de uracilo al ADN con lo que se inician mecanismos de ruptura y reparación que terminan con una fragmentación del ADN y muerte celular [12]; se ha demostrado que el bloqueo o el inadecuado funcionamiento de esta enzima lleva a letalidad en los organismos [14].

El grupo más común de dUTPasas, distribuidas en organismos desde mamíferos hasta bacterias y retrovirus, corresponden a un grupo de proteínas homotriméricas, compuestas fundamentalmente de hojas plegadas beta y presentan cinco dominios conservados localizados en las interfases de las subunidades donde se constituyen los sitios activos [15]. La dUTPasa de *T. cruzi*, por el contrario, es una proteína dimérica que no presenta ninguno de los 5 dominios conservados en los sitios de acción de las

proteínas homotriméricas y constituye una familia de secuencias diferentes en relación tanto a las proteínas monoméricas como las triméricas [16]. Se ha demostrado que la expresión de la dUTPasa es fundamental en *Leishmania major* y debido al alto grado de similitud de esta proteína entre tripanosomátidos se puede extrapolar la importancia a otros parásitos de la familia como *T. cruzi* [16].

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del blanco

Se realizó una búsqueda de las proteínas cristalizadas usando el parámetro “*Trypanosoma cruzi*” en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) y una selección basada en el menor porcentaje de similitud con proteínas humanas. Se tomaron secuencias en formato Fasta y se realizó el alineamiento de cada una usando la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local para proteínas pBLAST” del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos NCBI. Se eligió la base de datos psitKB/Swiss-Prot (swissprot) ya que esta es una base de datos exhaustiva y de alta calidad que abarca todas las secuencias tanto caracterizadas como inferidas disponibles públicamente [17]. En los parámetros del algoritmo, considerando el objetivo de la búsqueda, se usó la matriz de alineamiento BLOSUM 62, ya que esta matriz es superior que las matrices PAM para evaluación de homología y presenta mejores resultados comparativamente con BLOSUM 45 y BLOSUM 80 [18]. Se seleccionó el organismo *Homo sapiens*, se estableció un costo de brecha de 11 por existencia y 1 por extensión.

Los resultados se analizaron evaluando los valores de *query cover* e identidad obtenidos de los alineamientos, se tomó de base un umbral máximo de 10 % en el *query cover* para analizar las proteínas que cumplieran con porcentajes inferiores a ese valor. Se revisó la importancia biológica de la vía en la que actúa la enzima y si se habían conducido estudios que buscaran inhibidores de estas. Luego de esto, se realizó un análisis del sitio activo de la proteína; se corrió un protocolo de alineamiento PSI-BLAST y se compararon los resultados del pBLAST y el PSI-BLAST en las secuencias alineadas con los aminoácidos del sitio activo de la proteína para evaluar si se encontraban similitudes entre estos y evaluar la viabilidad de la proteína como blanco.

Análisis y preparación del blanco

Se evaluaron las estructuras cristalizadas de la proteína blanco elegida y se realizó la elección para el proceso de cribado, considerando que dicha estructura tuviera las subunidades en las que se encuentra el sitio activo y el ligando cristalizado. Posteriormente,

se revisó el reporte de validación de la estructura y se realizó la preparación de la misma usando el *software* maestro 11.3 de Schrödinger; para esto, se establecieron condiciones de pH de 7,3 para determinar los estados de protonación de las cadenas laterales ya que estas son las condiciones de pH a las que se encontrará la proteína en el parásito [19]; se evaluaron los residuos en los que se presentaban problemas en las cadenas laterales y se optimizaron. Luego de esto, la proteína procesada se llevó al *software* AutoDockTools-1.5.6 de Scripps donde se calcularon cargas atómicas parciales y se eliminó el ligando cristalizado para tener la estructura final que se sometió al proceso de cribado.

Considerando que la plataforma DrugDiscovery del Centro de Cómputo Avanzado de la Universidad de Texas (TACC) usa el sistema AutoDock Vina para realizar cribado virtual [20], se validó el método de acoplamiento realizando un reacoplamiento *in house* del ligando endógeno de la proteína usando el mismo *software* de cribado. Inicialmente, se usó AutoDockTools para determinar la posición tridimensional del ligando, se estableció el tamaño y las posiciones x , y y z del centro del grid en el sitio activo, el cual abarca la totalidad de este. De acuerdo con esto, los valores definitivos usados para el grid fueron: Centro x : 9779, Centro y : 3585, Centro z : 55 438; 68 puntos en dimensión x , 64 puntos en dimensión y , 66 puntos en dimensión z .

Luego se usó el *software* maestro para diseñar la estructura del ligando endógeno y se llevó dicha estructura al *software* MarvinSketch versión 18.24 de ChemAxon para determinar los estados de protonación y cargas parciales de la molécula a las condiciones de pH ya mencionadas, según los resultados de la especie mayoritaria a pH 7,3; se ajustaron cargas de la estructura en maestro y se llevó al *software* AutoDockTools para determinar enlaces rotables y cambiar formato de archivo para el proceso de acoplamiento. Con los archivos de ligando y proteína preparados se realizó el proceso de reacoplamiento usando los tamaños de grid y centros determinados previamente y se usó un valor de exhaustividad de 100; se realizó el proceso de acoplamiento del ligando móvil usando el *software* AutoDock Vina (Scripps) [21].

Se calculó el valor de desviación de raíz cuadrada media de posiciones atómicas (RMSD), entre el ligando cristalizado y el mejor resultado del acoplamiento para determinar si el valor es $\leq 2,5.0$ Å, considerando que esta es la medida aceptada para una conformación bien acoplada en relación con la estructura determinada experimentalmente [22].

Cribado virtual

Se corrió el proceso de cribado en la plataforma DrugDiscovery de TACC, usando el archivo de la proteína preparada y el tamaño de grid seleccionado previamente. Se usaron tres de las bases de datos disponibles: la base de prueba (base de resultados rápidos y número limitado de ligandos que permite obtener resultados previos de forma

rápida), la base de compuestos disponibles comercialmente de ZINC (46 702 ligandos) y la base de datos de compuestos naturales (194 090 ligandos).

Selección de moléculas candidato

De los resultados del proceso de cribado en TACC se tomaron aquellos que tenían mejores valores de *score* (valores de mejor energía libre de unión calculada con relación a la energía libre entre el blanco y el ligando endógeno), comparados con el resultado del reacoplamiento *in house* realizado durante la validación del método de acoplamiento. Para evaluar los resultados arrojados por TACC se realizó inicialmente una selección entre las moléculas que cumplían los valores adecuados de *score*, para esto, se revisaron en PyMOL estas moléculas y se descartaron aquellas que presentaban peso molecular mayor a 500 Dalton y estructuras con interacciones únicamente hidrofóbicas; posteriormente, a las moléculas restantes se les realizó un acoplamiento molecular *in house*, iniciando por las moléculas de mayor *score* para corroborar los datos entregados por TACC. Para esto, inicialmente se llevaron los archivos de las moléculas al *software* maestro, se prepararon las estructuras y se llevaron al *software* Marvin donde se realizaron los diagramas de distribución de especies, allí se determinó la especie mayoritaria a pH 7,3 para ajustar cargas y estados de protonación en el *software* maestro de la especie que se sometería a acoplamiento *in house*. Cada molécula fue llevada posteriormente al *software* AutoDockTools para revisar enlaces rotables y prepararla en el formato adecuado para el acoplamiento molecular. Posteriormente, se les realizó el proceso de acoplamiento con AutoDock Vina y se revisaron los resultados. Luego de esto, a cada molécula se le calcularon propiedades fisicoquímicas indicadoras de farmacocinética tales como Log*P*, aceptores y donadores de puentes de hidrógenos con el *software* Marvin y se evaluó potencial de toxicidad evaluando los resultados en 13 modelos de la plataforma Xundrug.cn. determinando la viabilidad de las moléculas para fases posteriores de investigación como estudios *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se decidió usar pBLAST para realizar la selección del blanco entre las proteínas cristalizadas de *T. cruzi* disponibles en PDB, considerando que la búsqueda del porcentaje de similitud entre secuencias a través de alineación básica local es un método para aproximarse a la identificación de homología entre proteínas [21]. Teniendo en cuenta que se buscaban las proteínas con el menor porcentaje de similitud en relación con proteínas humanas, se decidió tomar el valor límite de 10 % de *query cover* para evaluar aquellas que presentaban valores iguales o inferiores a dicho valor. Se excluyeron las proteínas que no presentaban similitud significativa (NR), ya que este resultado se puede presen-

tar en secuencias con valor esperado (E value) superior al umbral máximo establecido para el proceso (expect threshold); esto debido a que el valor E se ve afectado por la longitud de la secuencia [23]. Igualmente, se realizó la mencionada exclusión, considerando que dicho resultado se obtiene en proteínas con elevadas secuencias de baja complejidad, en las cuales, por el proceso de filtración del alineamiento se alteran los resultados por aumento de significancia estadística sin relación con importancia biológica [24].

Se evaluaron 271 secuencias, se excluyeron 51 del total de 322 arrojadas en la búsqueda, al corresponder a microorganismos diferentes a *T. cruzi*. Como se observa en la tabla 1, se encontraron siete secuencias que corresponde a tres proteínas con un porcentaje de *Query cover* inferior al 10 %. Dichas proteínas son: la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (código PDB 1II2), de la cual se alineó el 8 % de la secuencia con 32 % de identidad; la glucoquinasa (códigos 5BRD, 5BRE, 5BRF y 5BRH) con un 9 % de la secuencia alineada y 32 % de identidad y la dUTPasa (códigos 1OGL y 1OGK) 9 % de la secuencia alineada con 47 % de identidad.

Tabla 1. Listado de proteínas de *T. cruzi* con *query cover* inferior al 10 % en relación con proteínas humanas.

Código PDB	Nombre	<i>Query cover</i> (%)	Identidad (%)
1II2	PEPCK*	8	32
5BRD, 5BRE, 5BRF, 5BRH	Glucoquinasa	9	32
1OGL, 1OGK	dUTPasa	9	47

*PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Se seleccionó la dUTPasa considerando que, aunque las tres proteínas participan en vías metabólicas necesarias para la supervivencia del parásito, de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucoquinasa ya se han buscado inhibidores en otros trabajos [25, 26] y que la dUTPasa es una enzima que tiene diferencias estructurales importantes con proteínas de actividad catalítica similar en mamíferos y presenta una ventaja importante que corresponde a su doble función considerando que, además de generar el sustrato de la timidilato sintasa, evita que se aumente la proporción dUTP-dTTP, lo que es necesario para la supervivencia del parásito [12]. Revisando entonces los resultados del alineamiento de la dUTPasa se encontró que solo se obtuvo un valor significativo de alineamiento con proteínas humanas y corresponde a la proteína no caracterizada c4orf19 con valor E de 9,1; y al evaluar las dos secuencias se halló que no se presenta similitud en los aminoácidos del sitio activo. Del resultado del PSI-BLAST a la secuen-

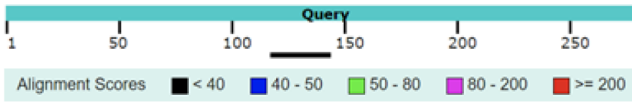
cia 1OGK se obtuvo que, para valores de E menores al umbral no se encontró ningún resultado, para valores de E superiores al umbral se obtuvieron 4 resultados en el que el mayor *query cover* corresponde a la proteína Anillin, en la cual, no se presenta similitud significativa con el sitio activo de la proteína dUTPasa. Demostrando con todo lo anterior, la viabilidad de la proteína como potencial blanco molecular.

A. sp|Q8IY42|CD019_HUMAN Uncharacterized protein C4orf19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4orf19 PE=1 SV=1
 Sequence ID: Query_247639 Length: 314 Number of Matches: 1

Range 1: 260 to 289

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
27.3 bits(59)	3e-04	Compositional matrix adjust.	14/30(47%)	18/30(60%)	3/30(10%)
Query 118	PAHAKSTAASGQR---	TNGGDSGDGDELLE	144		
	P HA SG R T+G DSDSD E+++				
Sbjct 260	PVHAMPVWDSGHRQEDTHGSDGDGEIVD	289			

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



B. sp|Q9NQW6|ANLN_HUMAN Anillin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANLN PE=1 SV=2
 Sequence ID: Query_164059 Length: 1124 Number of Matches: 1

Range 1: 913 to 1025

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
29.6 bits(65)	3e-04	Composition-based stats.	26/115(23%)	53/115(46%)	10/115(8%)
Query 162	NIIQLASIYRFDLITKGLLLAAQDLDFNLVGYVV-----AKYTLNQIRQLKGYKEGV	213			
	+I ++I+ + + G L A + +F LVG Y K+ L+++ L + +				
Sbjct 913	SITTKSNIHSSVMASPGGLSAVRTSNFALVGSVYTLSSLSSVGNTKFLVLDKVPFLSSLEGIH	972			
Query 214	YVKVREGVEDNELLHECVQSVSVEDVLENGTYLKAWEKIACSVDFAFGMPPEEERR	268			
	Y+K++ V N + E EDV G + + W ++ + + P++E+R				
Sbjct 973	YLKIKCQV--NSSVEERGFLTIFEDVSGFGAWHRRKCVLSGNCISYWTYPDDEKR	1025			

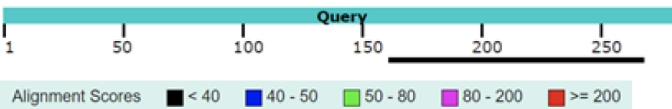


Figura 1. A. Alineamiento de secuencias entre la dUTPasa (1OGK) y la proteína no caracterizada c4orf19, único alineamiento de valor significativo con proteínas humanas usando pBLAST. B. Alineamiento con PSI-BLAST entre la dUTPasa y anillin, proteína que presentó el mayor *query cover* para valores de E superiores al umbral.

Considerando que se encuentran dos estructuras de la dUTPasa, reportadas por los mismos autores [16], las cuales corresponden a los códigos 1OGL y 1OGK, se realizó la evaluación de sus estructuras para realizar la selección. La estructura 1OGL presenta mejores parámetros de cristalización tales como: una resolución de 2,4 Å, valor de clashscore de 5,0 y porcentaje de valores atípicos de Ramachandran de 0.0%. Por

otra parte, la proteína 1OGK presenta una resolución de 2,85 Å, clashscore de 16 y porcentaje de valores atípicos de Ramachandran de 2,3 %. Sin embargo, se decidió usar la estructura 1OGK porque esta estructura se encuentra en complejo con el ligando y contiene las subunidades A y B, esto es necesario teniendo en cuenta que el sitio activo se ubica entre estas dos subunidades [16].

Adicionalmente, se revisó el reporte completo de validación de la estructura cristalo-gráfica de la proteína dUTPasa (código 1OGK) [27], encontrando que el valor de R, que se usa como medida de la calidad del modelo atómico, presenta un valor de 0,205, muy cercano al valor típico de 0,2 para este parámetro [28]. De igual forma, el valor de *R-free* que corresponde a una medida diseñada para reducir el sesgo presente en el valor R, presenta un valor de 0,267, cercano al valor típico de 0,26 [28, 29].

Adicionalmente, se evaluó la integridad del sitio activo de 1OGK, que corresponde a la zona que se usó para el cribado virtual y la identificación de potenciales inhibidores. Para esto, se tomó el reporte general de validación de la estructura y se revisaron los aminoácidos con valores atípicos de ángulos de enlace, se observaron valores alterados en 2 aminoácidos del sitio activo que corresponden a los residuos 52 (ácido glutámico) y 77 (ácido glutámico), ambos de la subunidad B; este último residuo presenta un valor atípico de longitud de enlace de 1,61 Å (átomos CG-CD) contra un valor ideal de 1,51 Å. En cuanto a la revisión de los ángulos diedros, en el mapa de Ramachandran, no se encontró ningún aminoácido con valores atípicos. Considerando que se tiene un valor de clashscore elevado, se evaluaron los solapamientos entre átomos, encontrándose que se reporta solapamiento de un hidrógeno del residuo 209 (tirosina) con un oxígeno del residuo 204 (arginina), ambos de la subunidad B, cuyo valor de superposición es de 0,49 Å. En tirosina 209, se reportó una superposición de 0,49 Å de un carbono con un hidrógeno de la lisina 63 de la subunidad A y con un carbono de este mismo residuo, lisina 63, con un valor de 0,46 Å. Asimismo, al usar la herramienta *Protein Preparation Wizard* de maestro, se encontró una superposición adicional entre el oxígeno del residuo 201 (asparagina) con un hidrógeno del residuo 205 (glicina) de la subunidad A.

De los 17 aminoácidos del sitio activo se encontraron problemas en 4 de ellos, por lo que se decidió realizar una preparación de la proteína con el módulo *Protein Preparation Wizard* del *software* maestro para solucionar los problemas observados desde el reporte de validación [27]. Considerando que todos los solapamientos observados en el sitio activo se presentaban con átomos de hidrógenos se decidió remover los hidrógenos originales antes de añadir hidrógenos en maestro y usar la herramienta para minimizar hidrógenos de especies alteradas; además de esto, se estableció un pH de 7,3 y usar la herramienta Propka determinando los estados de ionización de las especies de las cadenas laterales y las especies tautoméricas estables de las histidinas.

En la figura 2 se presenta el sitio activo de la dUTPasa de *T. cruzi* tanto en representación 3D como 2D con el ligando de la estructura cristalizada. Se muestran los aminoácidos con los que interactuaba el ligando endógeno, en este sitio se ubicó el grid para el proceso de cribado virtual.

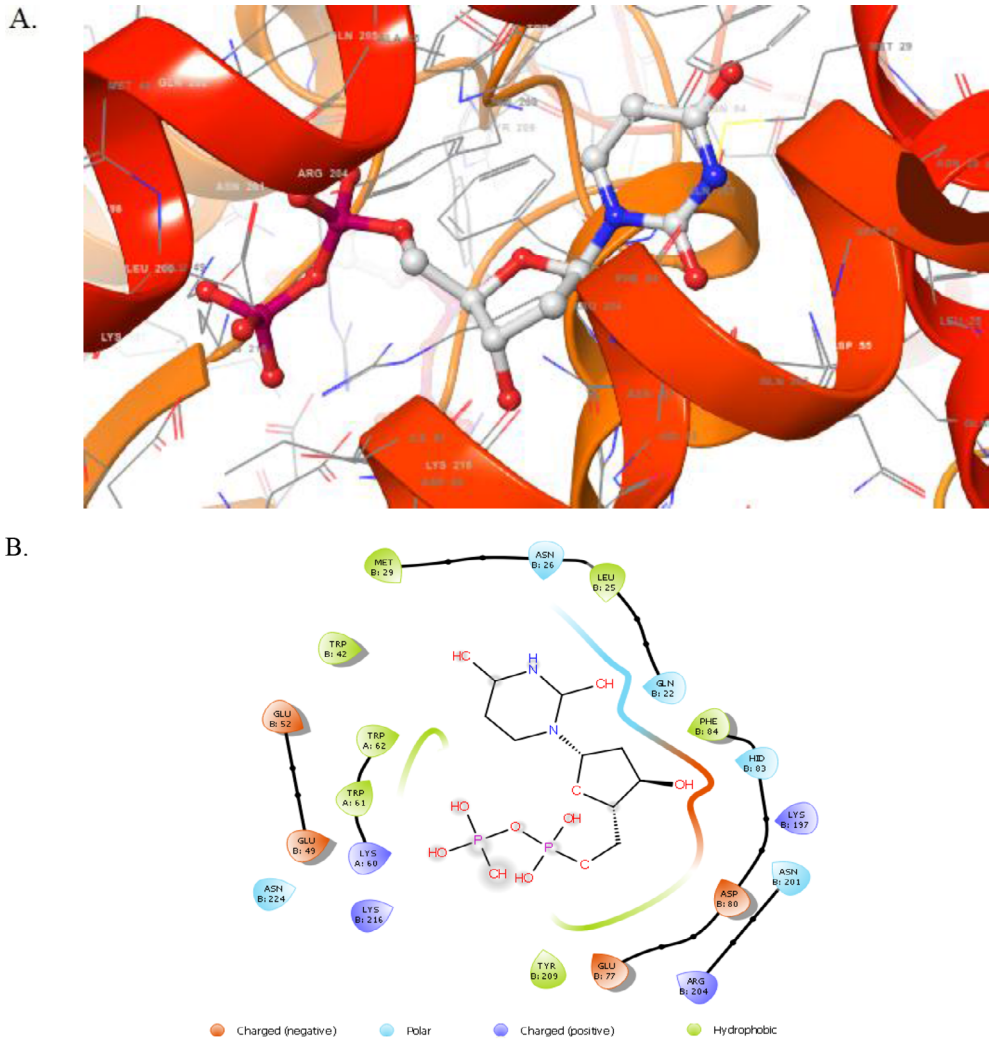


Figura 2.A. Vista 3D del sitio activo de la dUTPasa de *T. cruzi* con ligando cristalográfico dUDP (lugar de localización del grid). B. Vista 2D del sitio activo con los aminoácidos que presentan interacciones con el ligando.

Se usó AutoDock Vina, ya que además de ser el sistema usado por la plataforma Drug Discovery de TACC [20], es un programa calibrado con 30 complejos proteína ligando

con constantes de acoplamiento determinadas experimentalmente y es uno de los programas que predice las mejores posiciones con los mejores puntajes [30]. Para evaluar si las posiciones son correctamente acopladas en relación con la estructura determinada experimentalmente, se tomó la especie química mayoritaria a pH 7,3 del dUTP que se encuentra en un 48 % según se determinó usando *software* Marvin. El mejor resultado arrojado del proceso de acoplamiento en AutoDock Vina presentó una afinidad calculada de -8,9 kcal/mol, al determinar el valor de RMSD en PyMOL en relación con la estructura del ligando cristalizado se obtuvo un valor de 1,4 Å, demostrando que el programa usado para el acoplamiento es capaz de reproducir el modo de unión del ligando cristalizado.

CRIBADO VIRTUAL Y SELECCIÓN DE MOLÉCULAS CANDIDATO

Considerando que se buscan moléculas que puedan actuar como inhibidores competitivos de la enzima, se descartaron los resultados con valores de *score* más positivos que el obtenido para el dUTP (-8,9 kcal/mol). Así entonces, se descartaron todos los resultados de la base de prueba, ya que el mejor resultado de esta corresponde a la estructura con código ZINC C00001567 de *score* -8,4 kcal/mol. Después de realizar el análisis y exclusión de resultados por tamaño molecular y estructura química, se realizó un nuevo acoplamiento molecular (*in house*) de los potenciales candidatos, para confirmar el valor de energía libre de unión calculada usando AutoDock Vina. Se realizó dicho proceso de acoplamiento molecular *in house* considerando que, aunque la plataforma del TACC permite el acceso a potentes recursos computacionales con una interfaz de acceso intuitivo que permite el uso de una herramienta de acoplamiento molecular robusta como Autodock Vina [31], la plataforma tiene un estrecho rango de variables a modificar en los proyectos enviados permitiendo definir el sitio activo, el tamaño del grid, la librería, pero dejando varias variables fuera de alcance.

Por lo anterior, al no poder tener control sobre todas las variables del proceso de acoplamiento molecular, se realizó el acoplamiento *in house* usando el mismo *software* manejado por la plataforma, Autodock Vina, para validar los resultados obtenidos teniendo control sobre todos los parámetros del proceso de acoplamiento especialmente sobre la exhaustividad. Al igual que en el caso del dUTP, se evaluó la especie química mayoritaria a pH 7,3 para cada resultado considerando que el estado de protonación de la molécula tiene importancia en las interacciones entre ligando y la proteína, principalmente las electrostáticas que impactarán en la fuerza y especificidad de la unión [32]). Se observó que en todos de los casos la especie mayoritaria tenía carga neta de 0 y correspondía a un porcentaje superior al 87 %. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del acoplamiento *in house* para las potenciales moléculas candidato; se puede observar

que al controlar todos los parámetros del acoplamiento se presentan cambios en los resultados para algunas moléculas, sin embargo, no se excluyó ningún resultado considerando que todos los valores fueron más positivos que $-8,9$ kcal/mol. Las variaciones observadas en algunos resultados presentados en la tabla 2, pudieron ocurrir debido a que la exhaustividad usada por el AutoDock Vina del TACC pudo no ser suficiente para reproducir los resultados *in house*, posiblemente, debido a que el tamaño del grid, al ser superior a 30 \AA en cada eje, requería un aumento de exhaustividad [33].

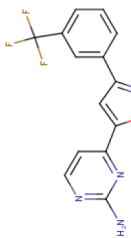
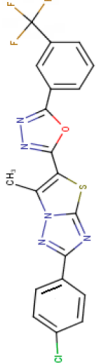
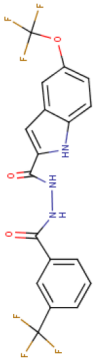
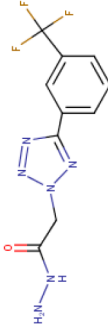
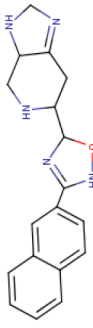
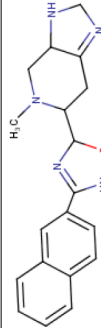
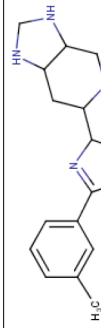
Tabla 2. Listado de potenciales moléculas candidato con su correspondiente puntaje de afinidad.

Código ZINC de la molécula	Base de datos	TACC (kcal/mol)	Porcentaje de la especie mayoritaria*	Acoplamiento <i>in house</i> (kcal/mol)**
ZINC00124103	ZINC	-11,7	100	-11,4
ZINC02157508	ZINC	-11,4	100	-11,4
ZINC01040055	ZINC	-11,1	99,1	-10,3
ZINC01044975	ZINC	-10,9	99,9	-10,8
ZINC15670188	ZINC N. P.	-11,5	87,3	-11,5
ZINC15670345	ZINC N. P.	-11,5	87,6	-11,4
ZINC20460463	ZINC N. P.	-11,3	95,9	-11,3
ZINC20464484	ZINC N. P.	-11,2	87,3	-11,2
ZINC15670144	ZINC N. P.	-11,2	87,6	-11,2
ZINC03846627	ZINC N. P.	-11,1	96,4	-11,1
ZINC01777088	ZINC N. P.	-11,0	99,9	-11,1
ZINC02203974	ZINC N. P.	-11,0	100	-11,0
ZINC09576136	ZINC N. P.	-11,0	96,5	-10,9

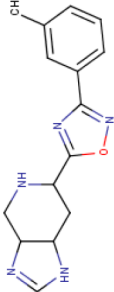
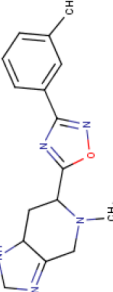
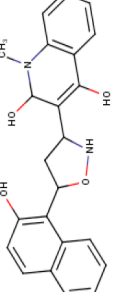
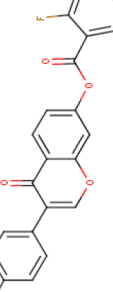
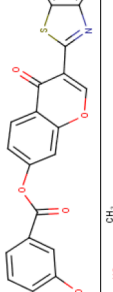
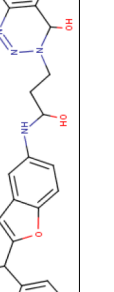
*Porcentaje de la especie química mayoritaria a pH 7,3 ** Sometida a acoplamiento *in house* (columna 5). La base de datos Zinc N.P. corresponde a la base de compuestos naturales.

Para la evaluación de características indicadoras de un adecuado perfil farmacocinético de un fármaco de administración oral, se realizó el análisis del perfil de absorción por vía oral, según las reglas de Lipinski, las cuales enuncian que una adecuada biodisponibilidad se tendrá en moléculas que cumplan al menos 3 de los siguientes criterios: masa molecular menor a 500 daltons, menos de 5 donadores, menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno y un valor de Log P calculado menor a 5 [34]). Según los resultados mostrados en la tabla 3, basados en los anteriores criterios, ninguna de las moléculas estudiadas presentaría pobre absorción por vía oral. Se observa que todas las moléculas cumplen al menos 3 de los criterios mencionados anteriormente, sin embargo, aunque alguna de las moléculas hubiera incumplido las reglas de Lipinski, no se excluiría de los análisis posteriores teniendo en cuenta que, a pesar de ser un criterio orientador en el desarrollo de fármacos no implica que el potencial

Tabla 3. Resultado de análisis de criterios de Lipinski para absorción por vía oral de las potenciales moléculas candidato seleccionadas.

Código ZINC de la molécula	Masa molecular (Dalton)*	Log P calculado*	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno**	Estructura química
ZINC00124103	322,37	2,64	1	5	
ZINC02157508	484,02	6,10	0	6	
ZINC01040055	449,43	4,42	3	6	
ZINC01044975	298,31	1,64	3	7	
ZINC15670188	350,52	2,42	3	6	
ZINC15670345	491,35	2,95	2	6	
ZINC20460463	295,42	1,18	4	6	

(Continúa)

Código ZINC de la molécula	Masa molecular (Dalton)*	Log P calculado*	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno**	Estructura química
ZINC20464484	283,33	1,07	2	6	
ZINC15670144	297,36	2,86	1	6	
ZINC03846627	390,16	3,09	4	6	
ZINC01777088	418,97	4,70	0	4	
ZINC02203974	455,65	3,60	0	6	
ZINC09576136	458,52	4,54	4	8	

*Determinado usando *software* MarvinSketch V. 18.2.4.

**Tomado como la suma de oxígenos y nitrógenos en la estructura molecular.

activo sea inviable desde punto de vista farmacocinético, dejando abierta la posibilidad, por ejemplo, de una administración parenteral [35]. Así entonces, este análisis se reporta para dar indicios de la vía de administración que podría llegar a ser usada en fases posteriores de investigación.

Adicionalmente, se evaluaron las moléculas bajo los 13 modelos de toxicidad disponibles en el servidor eMoltox que corresponden a toxicidad mitocondrial, hepática, cardíaca, respiratoria, renal, reproductiva, en sistema nervioso central, oral aguda, mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogénesis, citotoxicidad, sensibilización en piel y efectos sobre citocromo P450. eMoltox predice la toxicidad usando datos conocidos mediante un desarrollo de aprendizaje automático [36]. Se tomaron los datos de la principal acción que presenta el mayor valor de confianza por cada molécula.

Como se puede observar en la tabla 4, para la mayoría de estas moléculas los efectos tóxicos se podrían presentar a nivel hepático, esto se evidencia al predecirse efectos en proteínas como la bomba exportadora de sales biliares que es el principal transportador de lípidos y ácidos biliares en la membrana del canalículo de los hepatocitos y cuya expresión irregular se relaciona con alteración en la secreción de ácidos biliares [37]. También se puede observar que en las moléculas con códigos ZINC02157508 y ZINC01040055 se predicen posibles efectos en el receptor hepático X alfa o LRXa con valores de confianza superiores a 0,99; esta macromolécula actúa como sensor de colesterol y se tiene la hipótesis que participa en los mecanismos de regulación de conversión de colesterol a sales biliares regulando la expresión de la enzima 7 α -hidroxilasa, se ha demostrado que la actividad de esta enzima también se relaciona con la regulación de los niveles de LDL [38]. La molécula código ZINC01777088, según la predicción obtenida, podría tener efectos a nivel del receptor farnesoide X (FRX) que se expresa en altos niveles en tejidos intestinales y hepáticos y se encuentra asociado con la regulación de colesterol, glucosa, lípidos y ácidos biliares [39]. Por otra parte, las moléculas en las que se predice *in silico* la mayor seguridad son ZINC00124103 ya que el principal efecto relacionado con toxicidad corresponde a una inhibición metabólica de CYP 1A2, que corresponde al 13 % del citocromo en el hígado y es una de las enzimas más importantes relacionada con la biotransformación de medicamentos como acetaminofén, amitriptilina, propranolol y warfarina entre otros [40], y las moléculas ZINC01044975, ZINC20460463, ZINC20464484 y ZINC15670144, en las que no se encontraron efectos tóxicos en los modelos evaluados.

Al evaluar las interacciones entre los potenciales candidatos y la dUTPasa usando *free maestro*, se evidencia que todas las estructuras presentan interacciones con las regiones de unión a fosfatos, a uracilo y a desoxirribosa del dUTP. Como se observa en la tabla 5, la mayoría de los aminoácidos involucrados en las interacciones de los potenciales can-

Tabla 4. Valores de la principal acción tóxica y el valor de confianza de esta para las potenciales moléculas candidato.

Molécula (código ZINC)	Confianza	Acción
ZINC00124103	0,988	Inhibición de CYP1A2
ZINC02157508	0,998	Agonista del receptor hepático X alfa.
ZINC01040055	0,994	Agonista del receptor hepático X alfa.
ZINC01044975	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC15670188	0,983	Citotoxicidad diferencial contra líneas celulares de pollo DT40 isogénicas con vías conocidas de respuesta al daño en el ADN-Línea celular mutante Rad54 / Ku70
ZINC01777088	0,993	Antagonista de la vía de señalización del receptor X farnesoide (FXR)
ZINC02203974	0,997	Bloqueo de la bomba exportadora de sales biliares
ZINC20460463	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC20464484	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC15670144	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC03846627	0,995	Antagonista de la vía de señalización del receptor de estrógenos alfa.
ZINC15670345	1,0	Modulador de purinoreceptor P2X3.
ZINC09576136	0,995	Antagonista de la vía de señalización del receptor de estrógenos alfa.

didatos concuerdan con las reportadas para el ligando endógeno [16]. De los resultados mostrados en la tabla 5, se puede observar que por lo menos dos de los aminoácidos involucrados en la interacción con fosfatos en el dUDP, resultan ser de alta importancia para las potenciales moléculas candidato, dichos aminoácidos corresponden a Lisina 197 y Arginina 204 de la subunidad B; con el primero, se presentan interacciones tipo π -catión, puente de hidrógeno e interacciones dipolares en dos moléculas diferentes para cada tipo de interacción, en el caso la molécula con mejor puntuación (ZINC00124103), como se puede observar en la figura 3, este aminoácido además de presentar interacción tipo π -catión, actúa como donador de puente de hidrógeno lo que también sucede con la molécula ZINC01044975. En el caso de Arginina 204 de la subunidad B, se puede ver su importancia al presentar interacciones de diferentes tipos, ya sea puente de hidrógeno, π -catión o por dipolos con todas las potenciales moléculas candidato.

Se observa que en la región de unión a uracilo resultan ser importantes las interacciones hidrofóbicas al encontrarse que la mayoría de las moléculas evaluadas presentan interacción con metionina 29 de la subunidad B y triptófano 61 de la subunidad A, interacciones que presenta también el ligando endógeno. La naturaleza principalmente apolar

Tabla 5. Tipos de interacciones presentadas en la unión de las moléculas seleccionadas con el blanco y aminoácidos involucrados.

Molécula	Aminoácidos involucrados en cada interacción				
	Puente de Hidrógeno	Hidrofóbica	Polar (interacción con dipolos)	Interacción $\pi-\pi$ apilamiento $\pi-\pi$	Interacción π -catión
ZINC00124103	Glu B 77, Lys B 197	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Asp B 80, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Arg B 204, Lys B 216, Asn B 224	Trp A 62	Lys B 197
ZINC02157508		Trp A 61, Trp A 62, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Asp B 80, His B 83, Ser B 87, Arg B 204, Glu B 222	Trp A 62	Lys B 197, Lys B 216
ZINC01040055	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Ser B 87, Lys B 197, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Arg B 204, Lys B 216
ZINC01044975	Asp B 80, Lys B 197, Arg B 204	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Lys B 197
ZINC15670188	Lys B 197, Arg B 204	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, Ser B 87, Asn B 201, Glu B 222, Asn B 224	Trp A 62	
ZINC15670345	Lys B 197, Arg B 204	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, Ser B 87, Asn B 201, Glu B 222, Asn B 224	Trp A 62, His B 83, Phe B 84	
ZINC20460463	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Arg B 204, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197
ZINC20464484	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197, Arg B 204
ZINC15670144	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197
ZINC03846627	Lys B 197, Trp A 62	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Arg B 204, Lys B 216
ZINC01777088	Trp A 62, Lys B 216	Leu B 25, Met B 29, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Arg B 204, Lys B 197, Asp B 204	Trp A 62	Lys B 216
ZINC02203974	Trp A 62	Met B 29, Trp A 61	Lys A 60, Gln B 22, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, Lys B 97, Asn B 201, Arg B 204, Asn B 224	Trp A 62, His B 83, Phe B 84	Lys B 216
ZINC09676136	Glu B 52, Lys B 197, Arg B 204, Asn B 224	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Asp A 55, Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 77, Asp B 80, Asp B 83, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	

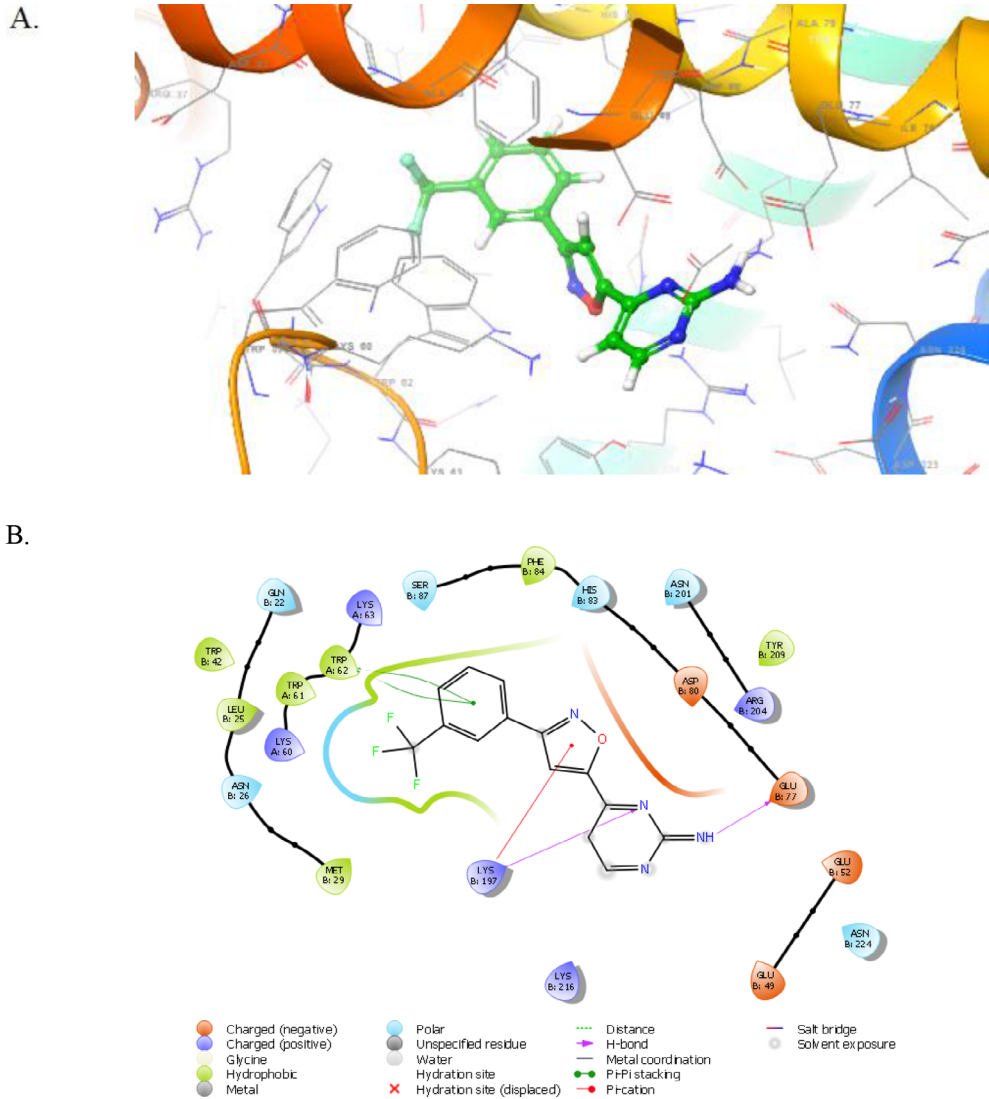


Figura 3. Interacciones de la molécula candidato que presentan la mejor puntuación, ZINC00124103 (4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-1}pirimidin-2-amina) con el sitio activo de la dUTPasa en vistas A. 3D y B. 2D.

de las partes de las moléculas que interactúan con esta región del receptor permite que se presenten interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos diferentes a los reportados para el ligando endógeno como leucina 25 y triptófano 42 de la subunidad B. También es importante resaltar que la interacción por apilamiento π - π que presentan las moléculas candidato con triptófano 62 de la subunidad A, en esta región de

unión con uracilo, parece tener gran importancia para la afinidad de los potenciales inhibidores teniendo en cuenta que todas las moléculas presentan esta interacción.

En dos de las moléculas en las que se calcularon las menores energías libres de unión (ZINC02157508, ZINC20460463) y por lo tanto en las que se esperarían los complejos de unión más estables, se observa interacción tipo pi-cación con lisina 197 por lo que se podría relacionar esta interacción con el incremento de estabilidad de la formación de complejo enzima-inhibidor.

Se excluye como potencial candidato a fármaco la molécula código ZINC15670345 considerando que esta solamente se diferencia en un metilo de la molécula código ZINC15670188, la presencia de dicho metilo no muestra interacciones adicionales con los aminoácidos de la proteína lo que es coherente con los resultados del proceso de acoplamiento mostrados en la tabla 2, donde se puede observar que la diferencia entre las puntuaciones de ambas moléculas es solamente de 0,1 kcal/mol siendo mayor en la molécula código ZINC15670188 lo que puede deberse a que la ausencia del grupo metilo en esta molécula favorece la formación de puentes de hidrógeno con Lisina 63 de la subunidad A.

De los resultados obtenidos se puede observar que la molécula que presenta un mejor balance entre los resultados indicadores de actividad y de seguridad *in-silico* corresponde a la molécula 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-1}pirimidin-2-amina con código ZINC00124103 ya que además de calcularse energía libre de unión de -11,4 kcal/mol, no se encontraron efectos severos dentro de los modelos de toxicidad. Así entonces, esta sería una primera opción para evaluación de dinámica molecular y escalado a estudios *in vitro* de seguridad y efectividad. Sin embargo, las moléculas restantes también podrían llegar a ser opciones viables teniendo en cuenta que en cuatro de ellas no se encontraron efectos de toxicidad *in silico*.

CONCLUSIONES

La proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* es un blanco viable para el diseño e investigación de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, esto se fundamenta entre otros, en la alta diferencia que presenta el sitio activo en comparación con proteínas que ejercen la misma actividad catalítica en humanos; así entonces, se hace viable la investigación de moléculas que actúen sobre este blanco como potenciales moléculas candidato. Debido a esto, se condujo una búsqueda de moléculas que tras procesos de acoplamiento presentan afinidad por la enzima blanco, encontrándose 12 moléculas con potencial unión y bloqueo del sitio activo de la enzima además de adecuadas características moleculares indicadoras de farmacocinética. Entre estas moléculas, la de menor energía libre de unión calculada con la proteína blanco y menores

posibilidades de efectos tóxicos corresponde a la 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-1}pirimidin-2-amina que puede ser una potencial molécula candidato para estudios posteriores de dinámica molecular y pruebas *in vitro* en cultivos del parásito.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al grupo de biología celular y autoinmunidad del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Roca Saumell, A. Soriano-Arandes, L. Solsona Díaz, J. Gascón Brustenga, Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas, *Atención Primaria*, **47**(5), 308-317 (2015).
2. V. Vidal, S. Ibañez, C. Martínez, Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México, *Salud Publica de México*, **42**(6), 496-503 (2000).
3. L.J. Robertson, Introduction: Some historical and geographical aspects and the relevance of Chagas disease among foodborne infections. En: B de Noya, O González, L.J Robertson (editors), *Trypanosoma cruzi as a Foodborne Pathogen*, Springer, London, 2015, Vol. 1, p. 1-5.
4. S. Sosa-Estani, E. L. Segura, Tratamiento de la infección por *Trypanosoma Cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización en la Argentina, *Medicina (Buenos Aires)*, **59**, 166-170 (1999).
5. S.R. Wilkinson, M.C. Taylor, D. Horn, J.M. Kelly, I. Cheeseman, A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(13), 5022-5027 (2008).
6. Ministerio de Protección social Colombia, *Guía de atención clínica de la enfermedad de Chagas 2010*, Convenio Cooperación técnica No 637 de 2009, URL: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Guia%20de%20atencion20clinica%20de%20chagas%202010.pdf>, consultado en marzo de 2019.

7. R.F. Sadok Menna-Barreto, K.T. Belloze, J. Perales, F.P. Silva, Proteomic and bioinformatic analysis of *Trypanosoma cruzi* chemotherapy and potential drug targets: new pieces for an old puzzle, *Curr. Drug Targets*, **15**(3), 255-271 (2014).
8. B.R. Miller, A.E. Roitberg, *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis), *Future Med. Chem.*, **5**(15), 1889-1900 (2013).
9. I. Beltran-Hortelano, S. Perez-Silanes, S. Galiano, Trypanothione reductase and superoxide dismutase as current drug targets for *Trypanosoma cruzi*: An overview of compounds with activity against Chagas disease, *Curr. Med. Chem.*, **24**(11), 1066-1138 (2017).
10. C.R. Lima, N. Carels, A.C. Guimaraes, P. Tufféry, P. Derreumaux, *In silico* structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*, *J. Mol. Model.*, **22**(10), 244 (2016).
11. C.R. Fonseca-Berzal, *Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas*, tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2017, p. 61-76.
12. V.M. Castillo-Acosta, *Papel de la desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa en la viabilidad celular y la integridad genética en Trypanosoma brucei*, tesis doctoral, Universidad de Granada e Instituto de parasitología y biomedicina "Lopez Neyra", 2007, p. 14-23.
13. M. Goulian, B. Bleile, B.Y. Tseng, Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **77**(4), 1956-1960 (1980).
14. H.H. el-Hajj, H. Zhang, B. Weiss, Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **170**(3), 1069-1075 (1988).
15. R. Persson, E.S. Cedergren-Zeppezauer, K.S. Wilson, Homotrimeric dUTPases: Structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **2**(4), 287-300 (2001).
16. M. Harkiolaki, E.J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J.P. Turkenburg, D. González-Pacanowska, K.S. Wilson, The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold, *Structure*, **12**(1), 41-53 (2004).
17. M. Schneider, L. Lane, E. Boutet, D. Lieberherr, M. Tognolli, L. Bougueleret, A. Bairoch, The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its Plant Proteome Annotation Program, *J. Proteomics*, **72**(3), 567-573 (2009).
18. S. Choudhuri, Sequence alignment and similarity searching in genomic databases: BLAST and FASTA, en: S. Choudhuri (editor), *Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*, Academic Press (Elsevier), London, 2014, vol. 1, p. 133-155.

19. N. Van Der Heyden, R. Docampo, Intracellular pH in mammalian stages of *Trypanosoma cruzi* is K⁺-dependent and regulated by H⁺-ATPases, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **105**(2), 237-251 (2000).
20. J. Allen, Texas Advanced Computing Center, DrugDiscovery@TACC Purpose, URL: <https://www.tacc.utexas.edu/research-development/tacc-projects/drug-discovery>, consultado en mayo 2019.
21. O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455-461 (2010).
22. K.W. Lexa, H.A. Carlson, Protein flexibility in docking and surface mapping, *Quart. Rev. Biophys.*, **45**(3), 301-343 (2012).
23. D. Xu, J.M. Keller, M. Popescu, R. Bondugula, *Applications of Fuzzy Logic in Bioinformatics*, Imperial College Press, London, 2008, vol. 9, p. 24.
24. National Center for Biotechnology information, *BLAST topics*, URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=BlastHelp#expec, consultado en junio de 2019.
25. J.A. Urbina, C.E. Osorno, A. Rojas, Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: *in vitro* and *in vivo* studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **282**(1), 91-99 (1990).
26. E.L. D'Antonio, M.S. Deinema, S.P. Kearns, T.A. Frey, S. Tanghe, K. Perry, T.A. Roy, H.S. Gracz, A. Rodriguez, J. D'Antonio, Structure-based approach to the identification of a novel group of selective glucosamine analogue inhibitors of *Trypanosoma cruzi* glucokinase, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **204**(2), 64-76 (2015).
27. M. Harkiolaki, E.J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J.P. Turkenburg, D. González-Pacanowska, K.S. Wilson, *Full wwPDB X-ray Structure Validation Report*, Protein Data Bank, URL: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/og/1ogk/1ogk_full_validation.pdf, consultado en junio 2019.
28. G.J. Kleywegt, T.A. Jones, Model building and refinement practice, *Methods in Enzymology* **277**, 208-230 (1997).
29. A.T. Brünger, Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature*, **355**, 472-475 (1992).

30. N.S. Pagadala, K. Syed, J. Tuszynski, Software for molecular docking: a review, *Biophys. Rev.*, **9**(2), 91-102 (2017).
31. U. Viswanathan, S.M. Tomlinson, J.M. Fonner, S.A. Mock, S.J. Watowich, Identification of a novel inhibitor of dengue virus protease through use of a virtual screening drug discovery Web portal, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**(10), 2816-2825 (2014).
32. M.L. García, B. De Pascual, M. Fernández, Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I., *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **70**, 325-356 (2004).
33. AutoDock Vina Manual, URL: <http://vina.scripps.edu/manual.html>, Consultado en junio 2019.
34. C. Abad-Zapatero, *Ligand Efficiency Indices for Drug Discovery*, Academic Press (Elsevier), London, 2013, vol. 1, p. 67-69.
35. M.Q. Zang, B. Wilkinson, Drug discovery beyond the 'rule-of-five', *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**(6), 478-488 (2007).
36. C. Ji, F. Svensson, A. Zoufir, A. Bender, eMolTox: prediction of molecular toxicity with confidence, *Bioinformatics*, **34** (14), 2508-2509 (2018).
37. I. Castro, M. Martínez, Transportadores de lípidos biliares: una revisión actualizada, *Gen.*, **67**(1), 49-57 (2013).
38. A.G. Sandoval, F. Manzur, D. Gómez, C. Gómez-A., Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares, *Rev. Colomb. Cardiol.*, **16**(1), 29-34 (2009).
39. A. Milona, Final Report Summary-MECHFXR (Towards FXR-mediated therapeutic intervention: Understanding how FXR integrates metabolic, endocrine and inflammatory signaling.), <https://cordis.europa.eu/project/rcn/103109/reporting/es>, consultado en febrero de 2019.
40. R.G. Argüello, El citocromo 1A2 (CYP 1A2) en una población universitaria de Costa Rica, *Rev. Costarric. Cienc. Méd.*, **23**, 25-31 (2002).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.A. Torres-Lemus, Á.P. Rojas-Rojas, F. López-Vallejo, Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 740-763 (2021).

A descrição teórica da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina, assistida pelo composto do oxihidróxido de cobalto (III) com um corante esquaraínico

Volodymyr V. Tkach^{1,2}, Marta V. Kushnir¹, Yana G. Ivanushko³, Sílvio C. De Oliveira², Lucinda Vaz dos Reis⁴, Petro I. Yagodynets¹, Zholt O. Kormosh⁵, Olga V. Luganska⁶, Vira V. Kopiika⁶, Natalia V. Novosad⁶, Adriano O. da Silva⁷

¹ Universidade Nacional de Chernivtsi, 58000, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrânia.

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

³ Universidad Estatal de Medicina de Bucovina, 58000, Praça Teatral. 9, Chernivtsi, Ucrânia.

⁴ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Folhadela, Vila Real, Portugal.

⁵ Universidade Nacional do Leste Europeu, 43000, Av. da Liberdade, 13, Lutsk, Ucrânia.

⁶ Universidade Nacional de Zaporizhzhia, 69600, Rua de Zhukovsky, 66, Zaporizhzhia, Ucrânia.

⁷ Universidade Nacional do Oeste do Pará, Rua Veríssimo José de Sousa Andrade, s/n, 68170-000, Juruti, PA, Brasil.

*Correio eletrônico: nightwatcher2401@gmail.com

Recebido: 1 de janeiro de 2020

Revisado: 18 de março de 2020

Aceto: 21 de abril de 2020

RESUMO

Introdução: a olanzapina é um dos fármacos antipsicóticos benzodiazepínicos mais usados no mundo. Apesar da sua eficiência, em concentrações excessivas, ela sói ser tóxica, como quaisquer outros fármacos desta classe. Assim, neste trabalho, se avaliou, pela primeira vez, a possibilidade da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina, assistida pelo composto do oxihidróxido de cobalto (III), emparelhado com o dióxido, com um corante esquaraínico. **Método:** o modelo matemático trivariante correspondente inclui dois cenários de oxidação do fármaco, possíveis para o caso, incluindo a eletropolimerização indireta da molécula da benzodiazepina condensada, bem como a oxidação do fármaco pelo átomo do enxofre. Este modelo tem sido desenvolvido

e analisado mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações. **Resultados e discussão:** a análise do modelo há mostrado que a hibridez do mecanismo do processo eletroanalítico, aliada à composição e decomposição dos compostos iônicos aquando da sua realização, aumenta a probabilidade da ocorrência do comportamento oscilatório, em relação ao caso mais simples e mais comum. No entanto, a instabilidade oscilatória se realiza nos valores dos parâmetros, que estão além do limite de detecção. Por sua vez, o estado estacionário se obtém e se mantém facilmente, indicando um processo eletroanalítico eficiente, controlado pela difusão do analito. **Conclusões:** trata-se de um processo eletroanalítico eficiente, em que o composto de cobalto funciona como substância ativa, e o corante desempenha o papel de mediador

Palavras-chave: olanzapina, sensores eletroquímicos, oxihidróxido de cobalto, corantes esquáricos, oscilações eletroquímicas, estado estacionário estável.

SUMMARY

The theoretical description for olanzapine electrochemical determination, assisted by the cobalt (III) oxyhydroxide composite with a squaraine dye

Introduction: olanzapine is one of the most used antipsychotic drugs in the world. Although it is efficient, it may be toxic in excess. Therefore, in this work the possibility of olanzapine electrochemical determination over an electrode, modified by the cobalt (III) oxyhydroxide in pair with its dioxide in a composite with squaraine dye. **Methods:** the trivariant correspondent mathematical model includes two scenarios of the drug oxidation, possible for the case, including the indirect electropolymerization of the condensed benzodiazepine molecule, like also its oxidation by sulfur atom. This model has been developed and analyzed by means of stability theory and bifurcation analysis. **Results and discussion:** the analysis of the model has shown that the mechanism hybridity of the electroanalytical process, alongside with the formation and decomposition of ionic compounds during its realization, augments the possibility for the oscillatory behavior realization, relatively to the simplest and commonest case. Nevertheless, the oscillatory instability is realized in parameter values far beyond the detection limit. On the other hand, the stable steady-state is easy to obtain and maintain, indicating an efficient electroanalytical process, controlled by the analyte diffusion. **Conclusions:** the electroanalytical process is efficient. The cobalt compound is acting as an active substance, and the dye is the mediator

Keywords: olanzapine, electrochemical sensors, cobalt oxyhydroxide, squaraine dyes, electrochemical oscillations, stable steady-state.

RESUMEN

La descripción teórica para la determinación electroquímica de olanzapina, asistida por el compuesto de oxihidróxido de cobalto (III) con un colorante de escuaraina

Introducción: la olanzapina es uno de los fármacos antipsicóticos más utilizados en el mundo. Aunque es eficaz, puede resultar tóxico en exceso. Por tanto, en este trabajo se plantea la posibilidad de la determinación electroquímica de olanzapina sobre un electrodo, modificado por el oxihidróxido de cobalto (III) en pareja con su dióxido en un composito con colorante de escuaraina. **Métodos:** el modelo matemático correspondiente incluye dos escenarios de oxidación del fármaco, posibles para el caso, que incluyen la electropolimerización indirecta de la molécula de benzodiazepina condensada, así como su oxidación por átomo de azufre. Este modelo ha sido desarrollado y analizado mediante teoría de estabilidad y análisis de bifurcación. **Resultados y discusión:** el análisis del modelo ha demostrado que el mecanismo de hibridación del proceso electroanalítico, junto con la formación y descomposición de compuestos iónicos durante su realización, aumenta la posibilidad de realización del comportamiento oscilatorio, relativamente al caso más simple y común. Sin embargo, la inestabilidad oscilatoria se realiza en valores de parámetros mucho más allá del límite de detección. Por otro lado, el estado estacionario estable es fácil de obtener y mantener, lo que indica un proceso electroanalítico eficiente, controlado por la difusión del analito. **Conclusiones:** el proceso electroanalítico es eficiente. El compuesto de cobalto actúa como sustancia activa y el colorante es el mediador.

Palabras clave: olanzapina, sensores electroquímicos, oxihidróxido de cobalto, colorantes de escuaraina, oscilaciones electroquímicas, estado estacionario estable.

INTRODUÇÃO

A olanzapina (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1-5]benzodiazepina, CAS: 132539-06-1, figura 1) é um dos fármacos antipsicóticos benzodiazepínicos mais usados no mundo [1-4]. O seu mecanismo de ação é bastante parecido com o da clozapina. Desta maneira, ele é usado com frequência no tratamento de esquizofrenia, síndrome bipolar e outras doenças do gênero. No entretanto, como qualquer

fármaco benzodiazepínico, a olanzapina tem efeitos colaterais como apatia, sonolência, aumento de peso, distúrbios de funções sexuais. Destarte, o desenvolvimento de um método, capaz de detectar a concentração da olanzapina é muito atual [5-8].

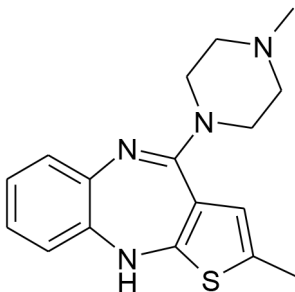


Figura 1. Olanzapina.

Como as benzodiazepinas são electroquimicamente ativas [9-12], a olanzapina também pode ser detectada por meio de um processo eletroquímico. Outrossim, a presença de um sistema conjugado mais comprido faz com que a olanzapina possa ser detectada tanto no cátodo como no ânodo. No último caso, o oxihidróxido de cobalto [13-16] seria um modificador bastante interessante. Sendo um semiconductor do tipo *p*, o oxihidróxido de cobalto é visto por parte dos pesquisadores como alternativa ao dióxido de titânio com um comportamento eletroquímico bastante flexível. Tendo o cobalto no estado de oxidação +3, o oxihidróxido de cobalto pode ser tanto oxidante como redutor. No último caso, usa-se o par oxirredutivo $\text{CoO}(\text{OH})\text{-CoO}_2$.

A estabilização do oxihidróxido de cobalto dar-se-á pela introdução de um material estabilizador como polímero condutor ou corante esquaraínico. Destarte, obter-se-á um material orgânico-inorgânico híbrido, em que cada componente assume as próprias funções no processo eletroanalítico.

No entretanto, o seu uso poderia acarretar uma influência comportamental, nociva à estabilidade do sistema e à sua eficiência eletroanalítica [17, 18]. Destarte, o uso prático deste sistema eletroanalítico não pode ser realizado sem uma descrição teórica prévia do comportamento do sistema, o que se faz neste trabalho.

Assim, neste trabalho, pela primeira vez, faz-se uma análise comportamental do sistema eletroanalítico da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina sobre o oxihidróxido de cobalto, emparelhado com o dióxido de cobalto (IV), estabilizado pelo corante esquaraínico. A análise comportamental do sistema eletroanalítico faz-se mediante o desenvolvimento e a análise do modelo correspondente. Com isto também se faz a comparação do comportamento do sistema eletroanalítico com o dos semelhantes [19-21].

O SISTEMA E O SEU MODELO

Esquemáticamente, o processo eletroanalítico da detecção eletroquímica da olanzapina, assistida pelo par $\text{CoO}(\text{OH})\text{-CoO}_2$ pode ser exposto conforme na figura 2.

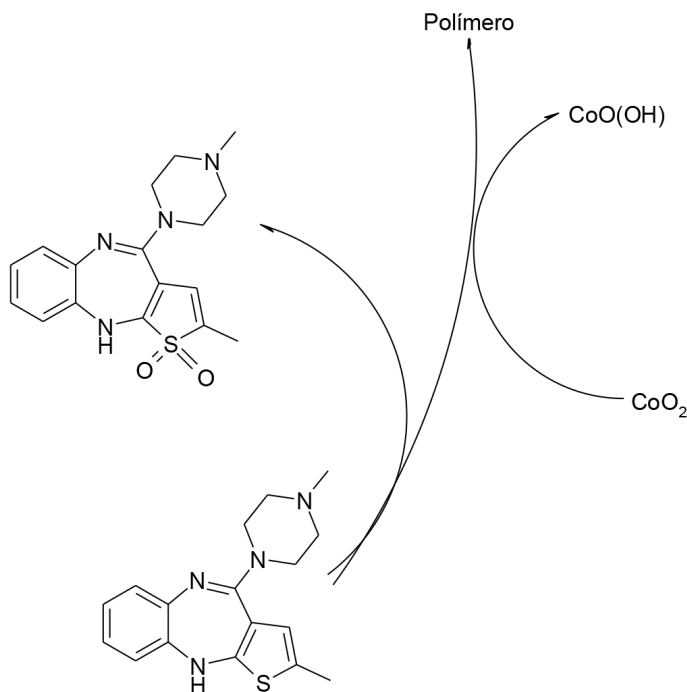


Figura 2. A representação esquemática da detecção eletroquímica da olanzapina sobre o par $\text{CoO}(\text{OH})\text{-CoO}_2$.

O corante esquaraínico, presente no sistema, desempenha o papel de estabilização de nanopartículas de ambas as formas de cobalto, bem como o de mediador da transferência de elétrons.

A Figura 2 mostra que dois cenários de oxidação do fármaco são possíveis para o caso. Além da eletropolimerização indireta da molécula da benzodiazepina condensada, em que todo o sistema conjugado aromático participa, existe, também, a possibilidade da oxidação do fármaco pelo átomo do enxofre, rendendo os derivados orgânicos do enxofre tetra-(sulfóxidos) ou hexavalente (sulfonas). Posto que estes derivados contêm um grupo aceitador forte de elétrons dentro do ciclo e, destarte, sejam mais passivos no processo da polimerização, intervêm nela, principalmente nos processos de transferência e interrupção dos centros de crescimento.

Assim, para descrever o comportamento do sistema com a detecção eletroanalítica da olanzapina, assistida pelo par $\text{CoO}(\text{OH})\text{-CoO}_2$, ser-nos-á necessário usar o conjunto de equações diferenciais de balanço na base das três variáveis:

o : concentração da olanzapina na camada presuperficial.

o^* : concentração do sulfóxido da olanzapina na camada presuperficial.

c : o grau de recobrimento da superfície pelo oxihidróxido de cobalto.

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja sob agitação intensa (destarte, podemos menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (destarte, podemos menosprezar o fluxo de migração). Outrossim, supomos que o perfil concentracional das substâncias na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ .

Diante do exposto, o comportamento do sistema será descrito por um conjunto de equações diferenciais (1), conforme:

$$\begin{cases} \frac{do}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{O}{\delta} (o_0 - o) - r_S - r_p \right) \\ \frac{do^*}{dt} = \frac{2}{\delta} (r_S - r_p) \\ \frac{dc}{dt} = \frac{1}{C} (r_S + r_p - r_o) \end{cases} \quad (1)$$

em que O é coeficiente de difusão da olanzapina, o_0 é a sua concentração no interior da solução, C é a concentração superficial máxima do oxihidróxido de cobalto, e r_S , r_p e r_o são, correspondentemente, as velocidades da S-oxidação, polimerização da olanzapina e oxidação do oxihidróxido do cobalto, que se podem calcular conforme:

$$r_S = k_S o (1 - c) \exp(-\alpha o) \quad (2)$$

$$r_p = k_p o^{n-x} o^*{}^x (1 - c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \quad (3)$$

$$r_o = k_o c \exp\left(\frac{F\varphi_0}{RT}\right) \quad (4)$$

Sendo os parâmetros k as constantes das velocidades das respectivas reacções, F é o número de Faraday, α é um parâmetro, que descreve a influência da aparição e desaparecimento de compostos iônicos na dupla camada eléctrica durante a etapa química na capacitância desta camada, φ_0 é salto do potencial, relativo ao potencial de carga zero, R é a constante universal de gases e T é a temperatura absoluta do reator.

Como se vê, em relação ao caso mais simples e mais geral, este aparece mais complicado, haja vista a hibridiz do processo eletroanalítico e formação e decomposição dos compostos iônicos. Sem embargo, o processo eletroanalítico mesmo assim segue sendo eficiente, conforme exposto abaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de investigar o comportamento do sistema com a determinação eletroanalítica da olanzapina, assistida pelo par $\text{CoO}(\text{OH})\text{-CoO}_2$, analisamos o conjunto de equações diferenciais (1), haja vista, também, as relações algébricas (2-4), mediante a teoria de estabilidade linear. Os elementos estacionários da matriz jacobiana para este sistema expõem-se segundo:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (5)$$

em que:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{o}{\delta} - k_s(1-c) \exp(-\alpha o) + \alpha k_s o(1-c) \exp(-\alpha o) - (n-x)k_p o^{n-x-1} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) + \alpha k_p o^{n-x} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (6)$$

$$a_{12} = \frac{2}{\delta} \left(-xk_p o^{n-x} o^{*x-1} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (7)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} \left(k_s o \exp(-\alpha o) + (2n-3)k_p o^{n-x} o^{*x} (1-c)^{2n-3} \exp(-\alpha o) \right) \quad (8)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} \left(k_s(1-c) \exp(-\alpha o) - \alpha k_s o(1-c) \exp(-\alpha o) - (n-x)k_p o^{n-x-1} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) + \alpha k_p o^{n-x} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (9)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} \left(-xk_p o^{n-x} o^{*x-1} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (10)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} \left(-k_s o \exp(-\alpha o) + (2n-3)k_p o^{n-x} o^{*x} (1-c)^{2n-3} \exp(-\alpha o) \right) \quad (11)$$

$$a_{31} = \frac{1}{c} \left(k_s(1-c) \exp(-\alpha o) - \alpha k_s o(1-c) \exp(-\alpha o) + (n-x)k_p o^{n-x-1} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) - \alpha k_p o^{n-x} o^{*x} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (12)$$

$$a_{32} = \frac{1}{c} \left(xk_p o^{n-x} o^{*x-1} (1-c)^{2n-2} \exp(-\alpha o) \right) \quad (13)$$

$$a_{33} = \frac{1}{c} \left(-k_s o \exp(-\alpha o) - (2n - 3)k_p o^{n-x} o^{*x} (1 - c)^{2n-3} \exp(-\alpha o) - k_o \exp\left(\frac{F\varphi_o}{RT}\right) - jk_o c \exp\left(\frac{F\varphi_o}{RT}\right) \right) \quad (14)$$

Observando os elementos (6), (10) e (14), podemos concluir que, neste sistema, o realizarem-se *as oscilações eletroquímicas* é mais provável que nos casos mais gerais [19-21]. Para a condição principal da instabilidade oscilatória (bifurcação de Hopf) ser satisfeita, é preciso haver, na diagonal principal da matriz, elementos positivos, correspondentes à positiva conexão de retorno.

Não havendo, neste sistema, etapas autocatalíticas, o comportamento oscilatório é causado pelos câmbios cíclicos da força iônica e, por conseguinte, a capacitância da dupla camada elétrica (DCE) não só durante as etapas eletroquímicas, mas também durante as químicas, já que, na olanzapina, o núcleo tiofênico é condensado com um anél diazepínico, e este, ligado com uma piperazina, ambas com propriedades expressamente básicas. Estes câmbios são representados pela positividade dos elementos, e .

Quanto às oscilações, elas se esperam frequentes e da amplitude, fortemente dependente da natureza do eletrólito de suporte. Num sal de ânion ou cátion orgânico, ou num líquido iônico, a amplitude vai ser maior, e num sal inorgânico, menor. Este efeito já foi observado experimentalmente durante a polimerização do tiofeno em [19]. De qualquer maneira, essas instabilidades só se realizam quando as influências supracitadas estão bastante intensas, o que se dá nos valores, afastados do limite de detecção.

Para investigar a *instabilidade do estado estacionário*, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (1) o critério Routh-Hurwitz. Para simplificar a análise do determinante, introduzimos as novas variáveis, de modo que se descreva o determinante segundo (15):

$$\frac{4}{\delta^2 c} \begin{vmatrix} -\kappa - \Omega - B & -\Sigma & \Lambda + K \\ \Omega - B & -\Sigma & K - \Lambda \\ \Omega + B & \Sigma & -\Lambda - K - Z \end{vmatrix} \quad (15)$$

que, havendo vista as propriedades do determinante, se reescreverá conforme (16):

$$\frac{4}{\delta^2 c} \begin{vmatrix} -\kappa - \Omega - B & -\Sigma & \Lambda + K \\ \kappa + 2\Omega & 0 & -2\Lambda \\ -\kappa & 0 & -Z \end{vmatrix} \quad (16)$$

o rearranjo da expressão (16), por sua vez, fá-la-á descrita por uma forma ainda mais simples (17):

$$-\frac{4\Sigma}{\delta^2 C} \begin{vmatrix} -2\Lambda & \kappa + 2\Omega \\ -Z & -\kappa \end{vmatrix} \quad (17)$$

Abrindo os parênteses retos e aplicando o requisito $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos a condição de estabilidade do estado estacionário no sistema, exposta conforme (18):

$$-\frac{4\Sigma}{\delta^2 C} (2\Lambda\kappa + Z\kappa + 2Z\Omega) < 0 \quad (18)$$

descrevendo um sistema eletroanalítico, controlado pela difusão do analito. O requisito (18) se satisfaz de forma garantida, mantendo-se negativos os valores dos parâmetros cinéticos Ω , Λ e Z , isto é, não sendo as influências das reações na força iônica da dupla camada elétrica assaz intensos para desestabilizar o comportamento do sistema. Assim, a satisfação do requisito (18) se dá numa região topológica vasta, confirmando que o oxihidróxido de cobalto, no seu composto com o corante esquarínico, pode ser um modificador eficiente de eletrodo para a detecção eletroanalítica do fármaco olanzapina.

Não havendo, neste processo, reações laterais, capazes de comprometer a estabilidade do analito e(ou) do modificador, a estabilidade do estado estacionário será correspondente à dependência linear entre a concentração do fármaco e o parâmetro eletroquímico (corrente). Assim, o sistema eletroanalítico se considerará eletroanaliticamente eficiente.

O limite de detecção é correspondente à *instabilidade monotônica*, cuja realização delimita os estados estacionários estáveis dos instáveis. A condição da sua realização pode ser descrita conforme:

$$-\frac{4\Sigma}{\delta^2 C} (2\Lambda\kappa + Z\kappa + 2Z\Omega) = 0 \quad (19)$$

Se, em vez da olanzapina, se usar um composto sem enxofre tiólico ou outro grupo capaz de ter um mecanismo paralelo de oxidação, $r_s=0$, e a variável σ^* se elimina do conjunto de equações diferenciais (1), tornando-o bivariante. O comportamento do sistema, assim, descrever-se-á conforme [20-21].

CONCLUSÕES

A análise teórica do processo eletroanalítico da detecção da olanzapina, assistida pelo par CoO(OH)-CoO_2 , estabilizado por um corante esquarínico, deixou concluir que:

- Se trata de um processo eletroanalítico eficiente, em que o composto de cobalto funciona como substância ativa, e o corante desempenha o papel de mediador.
- O processo eletroanalítico é controlado pela difusão da olanzapina.
- A realização do comportamento oscilatório é mas provável que no caso mais simples e comum, haja vista os câmbios cíclicos da força iônica da dupla camada elétrica.

- As oscilações se manifestam de maneira diferente a depender da natureza do eletrólito de suporte, sendo mais clara a sua aparência num líquido iônico ou num sal orgânico que num sal inorgânico.

- Não havendo mecanismos paralelos de oxidação, o modelo matemático, que descreve o processo, simplificar-se-á e corresponder-se-á ao caso mais simples.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. P.F. Buckley, Olanzapine: a critical review of recent literature, *Exp. Opin. Pharmacother.*, **6**, 2077-2089 (2005).
2. Y. Li, Ch. Du, N. Jiaxiang, *et al.*, Olanzapine versus placebo for people with schizophrenia, *Cochrane Database Sys. Rev.*, **2019**, ID: 13310 (2019).
3. L. San, M. Casillas, A. Ciudad, I. Gilaberte, Olanzapine orally disintegrating tablet: A review of efficacy and compliance, *CNS Neurosci. Ther.*, **14**, 203-214 (2008).
4. A. Kamath, K.M. Rai, R. Sheyras, *et al.*, Effect of domperidone, ondansetron, olanzapine-containing antiemetic regimen on QTC interval in patients with malignancy: a prospective, observational, single-group, assessor-blinded study, *Sci. Rep.*, **11**, 445 (2021).
5. M. Albayrak, Y. Kadioglu, M.E. Yaman, *et al.*, Determination of olanzapine for therapeutic drug monitoring in schizophrenia patients by LC/MS method, *Bio-med. Chromatogr.*, **33**, e4468 (2019).
6. M.-L. Lu, Ch.-H. Lin, Y-Ch. Chen, *et al.*, Determination of olanzapine and n-desmethyl-olanzapine in plasma using a reversed-phase HPLC coupled with coulochemical detection: Correlation of olanzapine or n-desmethyl-olanzapine concentration with metabolic parameters, *PLoS One*, **8**, e65719 (2013).
7. O.A. Adegoke, O.E. Thomas, S.N. Emmanuel, Colorimetric determination of olanzapine via charge-transfer complexation with chloranilic acid, *J. Taibah Univ. Sci.*, **10**, 651-663 (2016).

8. B. Reddy, K. Suresh Reddy, J. Sreeramulu, G. Kanumula, Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine by HPLC, *Chromatographia*, **66**, 111-114 (2007).
9. V.V. Tkach, S.C. de Oliveira, R. Ojani, *et al.*, A eletrorredução de benzodiazepinas e a sua avaliação matemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**, 362-373 (2016).
10. Sh. M. Azab, A.M. Fekry, Role of green chemistry in antipsychotics' electrochemical investigations using a nontoxic modified sensor in McIlvaine buffer solution, *ACS Omega*, **4**, 25-30 (2019).
11. R.P. Shukla, R.H. Belmaker, Y. Bersudsky, H. Ben-Yoay, A platinum black-modified microelectrode for *in situ* olanzapine detection in microliter volumes of undiluted serum, *J. Neural Transm.*, **127**, 291-299 (2020).
12. Th. Winkler, S. Lederer, R. Ghodssi, Molecular processes in an electrochemical clozapine sensor, *Biointerphases*, **12**, ID: 02B401 (2017).
13. M.S. Burke, M.G. Kast, L. Trotochaud, *et al.*, Cobalt-iron (oxy)hydroxide oxygen evolution electrocatalysts: The role of structure and composition on activity, stability, and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3638-3648 (2015).
14. A. Badruzzaman, A. Yuda, A. Ashok, A. Kumar, Recent advances in cobalt based heterogeneous catalysts for oxygen evolution reaction, *Inorg. Chim. Acta*, **511**, ID: 119854 (2020).
15. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaissi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital. Elec. J. Chem.*, **7**, 122-130 (2015).
16. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E. Guimarães Castro, *et al.*, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital Elec. J. Chem.*, **7**, 318-326 (2015).
17. O. Stadnik, N. Ivanova, Y. Boldyrev, 218th Int. Electrochem. Soc. Meeting, Abstract #2240, URL: <http://ma.ecsdl.org/content/MA2010-02/38/2240.full.pdf>, acessado 8 de agosto de 2015.
18. O. Stadnik, *Synthesis, Electrochemical and Photoelectrochemical Properties of the Oxide-hydroxide Compounds of Cobalt*, Diss. Kand. Chim., N.-Kyiv, 2011.
19. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Ind. J. Chem.*, **47**, 1798-1803 (2008).

20. V.V. Tkach, Ya. G. Ivanushko, S.M. Lukanova, *et al.*, The theoretical evaluation for the possibility of the pyriproxyfen CoO(OH)-assisted electrochemical detection in water, *Appl. J. Envir. Eng. Sci.*, **3**, 90-95 (2017).
21. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C. de Oliveira, *et al.*, Theoretical evaluation for the function of economical and green conducting composite material-based chip for Jamaican vomiting sickness diagnostics, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **11**, 10317-10324 (2021).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, Y.G. Ivanushko, S.C. de Oliveira, L. Vaz dos Reis, P.I. Yagodynets', Z.O. Kormosh, O.V. Luganska, V.V. Kopyika, N.V. Novosad, A.O. da Silva, A descrição teórica da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina, assistida pelo composto do oxihidróxido de cobalto (III) com um corante esquarainico, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 764-775 (2021).

Associação entre o consumo de café e de medicamentos psicoativos e a qualidade do sono de estudantes universitários

Karina Petean Grassi¹, Rafaela Sirtoli², Renne Rodrigues², Daniela Frizon Alfieri³, Camilo Molino Guidoni⁴, Giovana Frazon de Andrade², Edmarlon Giroto^{4*}

¹ Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina (UEL).

² Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Universidade Estadual de Londrina (UEL).

⁴ Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina (UEL).

*Correspondência para:

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

Avenida Robert Koch, n 60 – CEP: 86.038-440, Vila Operária, Londrina, Paraná, Brasil

Telefone/Fax: (43)3371-2475

E-mail: edmarlon78@gmail.com

Recebido: 5 de fevereiro de 2021

Revisado: 25 de abril de 2021

Aceto: 28 de abril de 2021

RESUMO

Introdução: o sono pode ser alterado com o uso de psicofármacos e consumo de café, dessa forma este estudo teve a finalidade de analisar a qualidade do sono dos estudantes universitários e sua relação com o consumo dessas substâncias, realizou-se um estudo transversal com universitários com 18 anos ou mais. **Métodos:** A coleta de dados ocorreu por meio de um questionário online entre abril e junho de 2019. A variável dependente foi a qualidade de sono e as variáveis independentes foram o consumo de medicamentos psicoativos e consumo elevado de café. Para as análises de associação foi utilizada a regressão de poisson com variância robusta, com cálculo da razão de prevalência (RP) e intervalo de confiança à 95 % (IC 95 %). **Resultados:** dentre os estudantes avaliados ($N=2721$), a prevalência de má qualidade do sono foi de 75,6 %. O consumo de medicamentos psicoativos e consumo elevado de café foi de 11,2 % e 14,1 %, respectivamente. A má qualidade de sono demonstrou maior

prevalência em estudantes que utilizam medicamentos psicoativos (RP 1,11; IC 95 % 1,06-1,16), consomem elevada quantidade de café (RP 1,06; IC 95 % 1,01-1,11), ou utilizam uma das duas substâncias (RP 1,10; IC 95 % 1,06-1,15). **Conclusão:** o presente estudo demonstrou haver associação entre má qualidade do sono e uso de psicoativos e maior consumo de café em universitários, o que atrelado à elevada prevalência de má qualidade do sono em universitários demonstra a importância do manejo adequado do uso destes produtos, bem como ações de prevenção e resolução de distúrbios do sono.

Palavras-chave: Estudantes, transtornos do sono, psicofármacos, café.

SUMMARY

Association between the consumption of coffee and psychoactive drugs and the quality of sleep of university students

Introduction: sleep can be altered with the use of psychotropic drugs and coffee consumption, so this study aimed to analyze the quality of sleep of university students and its relationship with the consumption of these substances, a cross-sectional study was carried out with university students aged 18 years or over. **Methods:** Data collection took place through an online questionnaire between April and June 2019. The dependent variable was sleeping quality and the independent variables were consumption of psychoactive medications and high consumption of coffee. For the association analyses, Poisson regression with robust variance was used, with calculation of the prevalence ratio (PR) and confidence interval at 95 % (95 % CI). **Results:** among the evaluated students (N=2721), the prevalence of poor sleep quality was 75.6 %. The consumption of psychoactive drugs and high consumption of coffee was 11.2 % and 14.1 %, respectively. Poor sleep quality was more prevalent in students who use psychoactive medications (PR 1.11; 95 % CI 1.06 to 1.16), consuming a high amount of coffee (PR 1.06; 95 % CI 1.01- 1.11), or use one of the two substances (RP 1.10; 95 % CI 1.06-1.15). **Conclusion:** the present study showed an association between poor sleep quality and the use of psychoactive drugs and higher coffee consumption in college students, which, together with the high prevalence of poor sleep quality in college students, demonstrates the importance of proper management of the use of these products, as well as actions to prevent and resolve sleep disorders.

Keywords: Students, sleep disorders, psychopharmaceuticals, coffee.

RESUMEN

Asociación entre consumo de café y drogas psicoactivas y calidad del sueño de estudiantes universitarios

Introducción: el sueño se puede alterar con el uso de psicofármacos y el consumo de café, por lo que este estudio tuvo como objetivo analizar la calidad del sueño de los estudiantes universitarios y su relación con el consumo de estas sustancias, se realizó un estudio transversal con estudiantes universitarios de 18 años o más. **Métodos:** La recolección de datos se realizó a través de un cuestionario en línea entre abril y junio de 2019. La variable dependiente fue la calidad del sueño y las variables independientes fueron el consumo de medicamentos psicoactivos y el alto consumo de café. Para los análisis de asociación se utilizó la regresión de Poisson con varianza robusta, con cálculo de la razón de prevalencia (RP) y el intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %). **Resultados:** entre los estudiantes evaluados (N = 2721), la prevalencia de mala calidad del sueño fue del 75,6 %. El consumo de psicofármacos y alto consumo de café fue de 11,2 % y 14,1 %, respectivamente. La mala calidad del sueño fue más prevalente en los estudiantes que usan medicamentos psicoactivos (PR 1,11; IC del 95 %: 1,06 a 1,16), que consumen una gran cantidad de café (RP 1,06; IC del 95 %: 1,01 a 1,11) o consumen una de las dos sustancias (RP 1,10; IC 95 % 1,06-1,15). **Conclusión:** el presente estudio mostró una asociación entre la mala calidad del sueño y el uso de psicofármacos y un mayor consumo de café en estudiantes universitarios, lo que, junto con la alta prevalencia de mala calidad del sueño en estudiantes universitarios, demuestra la importancia de un adecuado manejo del uso de estos productos, así como acciones para prevenir y resolver los trastornos del sueño.

Palabras clave: Estudiantes, trastornos del sueño, psicofármacos, café.

INTRODUÇÃO

Diversas fases da vida podem se associar a alterações do processo saúde-doença dos indivíduos, com marcantes modificações nos hábitos de vida e implicações para a saúde, sobretudo no período de transição para a fase adulta [1]. O processo de amadurecimento de adultos jovens apresenta uma série de mudanças e aumento de responsabilidades [2]. Isso pode ser observado principalmente em estudantes universitários, os quais lidam com exigências acadêmicas, necessidade de adaptação às cargas horárias distintas e autodisciplina, em alguns casos acontece concomitante com o trabalho [3], e conseqüentemente influi em alteração comportamental [1].

Em razão do complexo panorama, têm sido observado um aumento expressivo na prevalência de transtornos mentais [4] em adultos jovens, que direta e indiretamente podem alterar outros condicionantes de qualidade de vida, como a qualidade do sono [1]. Alterações do sono manifestam-se frequentemente em estudantes universitários [5], o que pode ter influência direta no aumento do estresse promovido pela nova rotina [6].

Com o aumento dos transtornos mentais, pode também ocorrer o aumento da busca por agentes os quais minimizam esses sintomas, o que pode justificar a maior prevalência de automedicação em universitários em comparação com adolescentes ou com adultos jovens não universitários [7], além da prevalência de substâncias psicoativas [8]. Dentre essas substâncias destacam-se o consumo de café [9], antidepressivos, hipnóticos/sedativos e ansiolíticos [8].

Embora os distúrbios do sono aumentem com o envelhecimento [10], essas alterações se iniciam a partir da adolescência [11]. Uma forma de contornar as alterações do sono é pelo consumo de cafeína, pois melhora as funções mentais, como concentração e atenção [12]. Por outro lado, em doses elevadas, é possível o surgimento de ansiedade [13], seguida de má qualidade de sono [14]. Além disso, a utilização de medicamentos psicoativos, que auxiliam em situações de má qualidade de sono, pode apresentar ação importante na insônia e em problemas pra dormir [15].

Dessa forma, pode-se sugerir a presença relações entre o uso de medicamentos psicoativos, consumo de café e qualidade do sono, carecendo de estudos que ajudem a compreender essa relação em universitários. Diante disso, o presente estudo objetiva analisar a associação do uso dessas substâncias psicoativas com a qualidade do sono de estudantes universitários.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, componente de um estudo maior denominado GradaUEL (análise da saúde e hábitos de vida dos estudantes de graduação da Universidade Estadual de Londrina), que teve como objetivo de analisar aspectos relacionados à saúde física e mental, à exposição a violências e aos hábitos de vida de estudantes universitários da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram incluídos todos os estudantes com matrícula ativa no ano letivo de 2019 em um dos 50 cursos de graduação presenciais e um à distância da UEL e com idade igual ou superior a 18 anos, totalizando 12 970 estudantes [16].

O instrumento de pesquisa foi composto pelas seguintes temáticas: caracterização acadêmica e sociodemográfica, hábitos de vida, sono, sintomas depressivos, síndrome de Burnout, violência, e consumo de medicamentos. Após a finalização da primeira versão do instrumento, ele foi submetido à revisão por pares entre os pesquisadores responsáveis pela sua construção. Em seguida, foi encaminhado à avaliação de conteúdo por especialistas da área e, sendo constatadas eventuais necessidades de correção e adequação, elas foram realizadas.

A coleta foi precedida por um pré-teste e um estudo piloto, respectivamente em instituições privada e federal de ensino superior da região. Os dados foram coletados a partir de uma plataforma digital online (*Google Forms*) durante o período de 29 de abril a 28 de junho de 2019. Durante o período de coleta de dados foi realizada a divulgação da pesquisa e dos seus objetivos por meio impresso, e-mail, redes sociais, visita à todas as turmas presenciais e televisão e rádio da universidade.

A variável dependente deste estudo foi a qualidade de sono, avaliada por meio da escala *Pittsburgh Sleep Quality Index* (PSQI) [17], versão traduzida e validada no Brasil [18]. Após o término da coleta, os dados foram exportados para uma planilha do Microsoft Excel®, e duplamente conferidos para identificar e corrigir possíveis inconsistências. O cálculo da escala PSQI foi realizado em triplicata seguindo os preceitos preconizados pela ferramenta original [17, 18], além da exclusão das análises de indivíduos que relataram duração do sono menor que 3 horas, latência do sono superior a 300 minutos ou que apresentaram eficiência habitual do sono acima de 100 %, e nos casos que relataram duração do sono 30 minutos a mais do que o tempo de permanência na cama. Foi utilizado o ponto de corte >5 para determinação da má qualidade do sono [17, 18].

As variáveis independentes foram o consumo de café e a utilização de medicamentos psicoativos. O consumo de café foi avaliado com base nos últimos 30 dias, categorizado em consumo elevado da seguinte forma: sim (quatro a cinco vezes ao dia ou seis ou mais vezes ao dia) ou não (quase nunca/nunca, menos de uma vez ao dia ou uma a três vezes ao dia) [19]. A utilização de medicamentos foi avaliada com base no uso de medicamentos contínuos, seguindo a classificação *Anatomical Therapeutic Chemical* (ATC), da Organização Mundial da Saúde [20]. Foram consideradas apenas as classes: N05B (Ansiolíticos), N05C (Hipnóticos e Sedativos) e N06A (Antidepressivos), denominados, para a presente investigação, “medicamentos psicoativos”.

Com o objetivo de caracterizar a população de estudo, foram utilizadas as seguintes variáveis: sexo (masculino; feminino), idade (18 a 20 anos; 21 a 23 anos; 24 anos ou mais), período noturno do curso (sim; não), satisfação com o curso (muito satisfeito/satisfeito; nem satisfeito, nem insatisfeito; insatisfeito/muito insatisfeito), índice de

massa corporal (IMC) (kg/m^2) ($\leq 18,5$; $18,5$ até $< 25,0$; $25,0$ até $< 30,0$; $\geq 30,0$) [21] e indicativo de depressão (sim; não). O índice de massa corporal foi calculado a partir do peso e altura autorrelatados. O indicativo de depressão foi designado a partir do *Patient Health Questionnaire-9* (PHQ-9), com ponto de corte ≥ 9 para indicativo de depressão [22].

A análise estatística foi realizada por meio de análises descritivas com frequências absolutas e relativas, e análise de associação, por meio da Regressão de Poisson com variância robusta, para cálculo da razão de prevalência (RP) e intervalo de confiança à 95 % (IC 95 %), utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19. Também foi realizada a RP ajustada para possíveis fatores de confusão com as variáveis de caracterização (sexo, idade, período noturno do curso, satisfação com o curso, índice de massa corporal e indicativo de depressão), sendo as variáveis idade e IMC utilizadas de forma contínua.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 04456818.0.0000.5231). Todos os participantes foram apresentados aos objetivos da pesquisa e ao termo de consentimento livre e esclarecido, os quais assinalaram-no eletronicamente de modo autônomo, antes de terem acesso ao instrumento de pesquisa.

RESULTADOS

O questionário foi preenchido por 3525 estudantes, entre os quais 3252 preencheram os requisitos exigidos. Foram excluídos 517 indivíduos por não responderem completamente a escala PSQI. Logo, a população final de estudo foi constituída por 2721 universitários (figura 1), sendo a maioria do sexo feminino (68,1 %) e com idade entre 18 e 20 anos (44,8 %). Cerca de um terço dos estudantes apresentaram $\text{IMC} \geq 25,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ e o indicativo de depressão identificado em 73,4 % dos estudantes (tabela 1).

Verificou-se, ainda, que o consumo de medicamentos psicoativos foi de 11,2 %, principalmente de antidepressivos (91,8 % dos psicoativos utilizados). O consumo elevado de café foi relatado por 14,1 % dos estudantes. Em relação à qualidade do sono, identificou-se má qualidade do sono em 75,6 % dos estudantes (tabela 1).

Em análise controlada por fatores de confusão, a má qualidade do sono apresentou maior prevalência entre os estudantes que utilizam medicamentos psicoativos (RP 1,11; IC 95 % 1,06-1,16) e apresentam consumo elevado de café (RP 1,06; IC 95 % 1,01-1,11), bem como aqueles que utilizam medicamentos psicoativos ou apresentam consumo elevado de café (RP 1,10; IC 95 % 1,06-1,15) (tabela 2).

Tabela 1. Características gerais dos estudantes universitários, GraduaUEL, 2019.

Variáveis	N.º	%
Sexo (n=2721)		
Feminino	1854	68,1
Masculino	867	31,9
Idade, em anos (n=2721)		
18 a 20	1220	44,8
21 a 23	943	34,7
≥24	558	20,5
Índice de massa corporal, Kg/m ² (n=2708)		
≤18,5	250	9,2
18,5 até <25,0	1601	59,1
25,0 até <30,0	586	21,7
≥30,0	271	10,0
Período do curso noturno (n=2721)		
Não	1975	72,6
Sim	746	27,4
Satisfação com o curso (n=2718)		
Muito satisfeito/satisfeito	1985	73,1
Nem satisfeito, nem insatisfeito	555	20,4
Insatisfeito/muito insatisfeito	178	6,5
Indicativo de depressão (n=2669)		
Não	711	26,6
Sim	1958	73,4
Consumo de psicoativos (n=2721)		
Não	2415	88,8
Sim	306	11,2
Tipo de psicoativo (n=340)*		
Antidepressivos	281	91,8
Hipnóticos/sedativos	42	13,7
Ansiolíticos	17	5,5
Consumo elevado de café (n=2719)		
Não	2336	85,9
Sim	383	14,1
Qualidade do sono (n=2721)		
Boa	663	24,4
Ruim	2058	75,6

*O número total de substâncias (n=340) é maior do que o número de usuários (n=306) em razão de alguns estudantes utilizarem mais de um medicamento psicoativo.

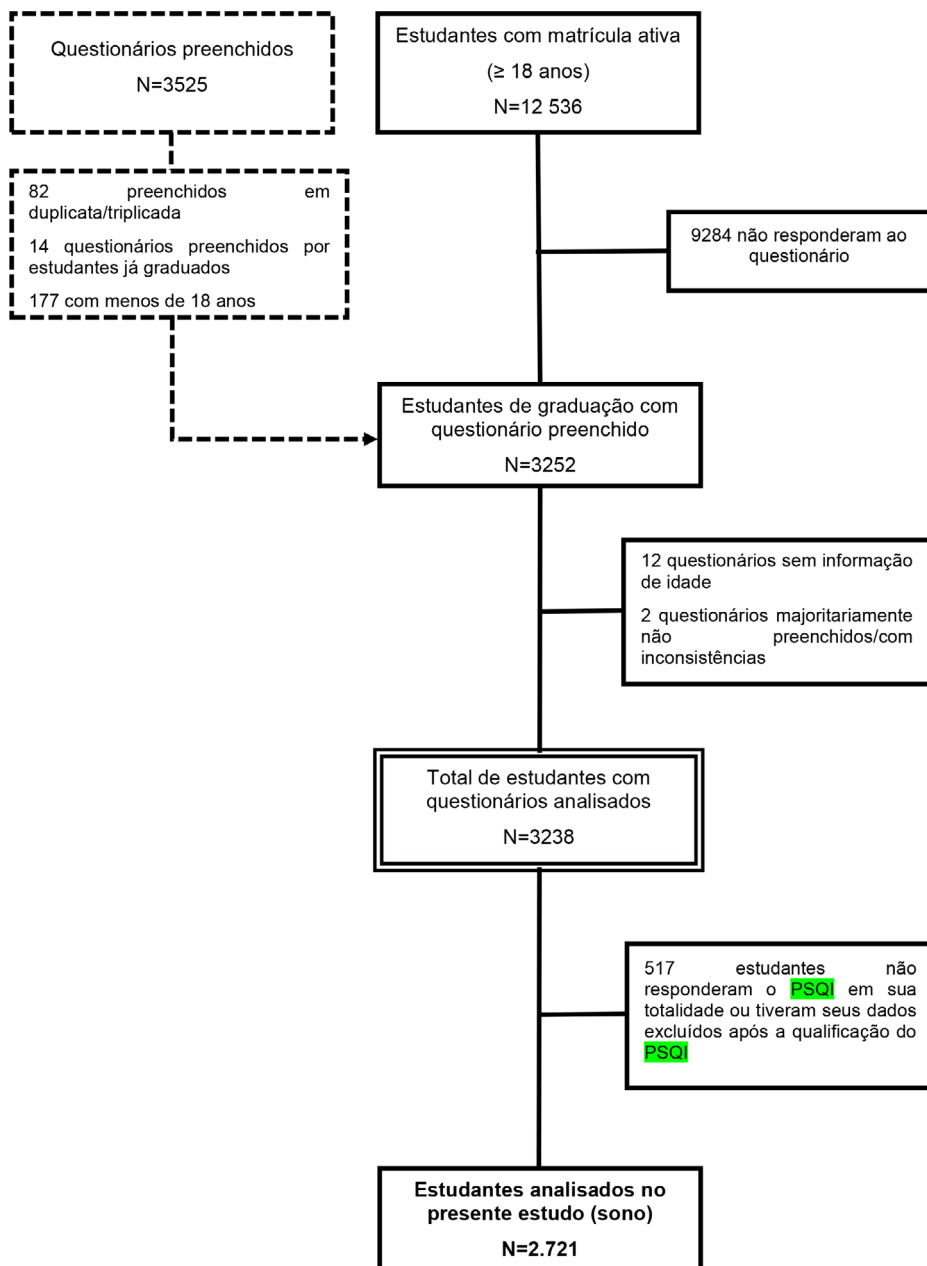


Figura 1. Fluxograma de apuração da amostra de estudo.

Fonte: GraduaUEL, 2019.

Tabela 2. Qualidade do sono ruim segundo uso de medicamentos psicoativos e/ou consumo elevado de café (análise bruta e ajustada), GraduaUEL, 2019.

Variáveis independentes	Qualidade do sono ruim	RP bruta (IC 95 %)	RP ajustada (IC 95 %)**
Uso de medicamentos psicoativos			
Sim	275 (89,9)	1,22 (1,16-1,27)*	1,11 (1,06-1,16)*
Não	1783 (73,8)	1,00	1,00
Consumo elevado de café			
Sim	318 (83,0)	1,12 (1,06-1,17)*	1,06 (1,01-1,11)**
Não	1739 (74,7)	1,00	1,00
Uso de medicamentos psicoativos e consumo elevado de café			
Sim	38 (86,4)	1,14 (1,02-1,29)**	1,00 (0,89-1,13)
Não	2020 (75,5)	1,00	1,00
Uso de medicamentos psicoativos ou consumo elevado de café			
Sim	555 (86,0)	1,19 (1,14-1,24)*	1,10 (1,06-1,15)*
Não	1503 (72,4)	1,00	1,00

*p<0,001; **p<0,05. ***Ajustado por sexo, idade (contínua), período noturno do curso, satisfação com o curso, índice de massa corporal (contínua) e indicativo de depressão.

DISCUSSÃO

A maioria dos participantes desta pesquisa demonstrou má qualidade de sono (75,6 %) e a associação com o uso de substâncias psicoativas e consumo de café confirmam a hipótese desta investigação. Diversos estudos analisaram as condições de sono de estudantes universitários, os quais identificaram altos níveis de transtornos do sono [23-26], condizente com este estudo. Inclusive, é um problema que tem apresentado tendência de aumento, visto que em uma pesquisa realizada em 2018, na Noruega, foi constatado que 30,5 % dos estudantes relataram problemas de sono, em contraste com 22,6 % em 2010 [27].

O uso de medicamentos psicoativos encontra-se cada vez mais presente, dado que foi observado que a prevalência de diagnósticos de insônia atribuídas por médicos aumentou de 3,9 % em 2006 para 6,2 % em 2013. Assim como houve um crescimento do uso de medicamentos que auxiliam no sono, passando de 21,0 % em 2006 para 29,6 % em 2013, indicando maior conhecimento e tratamento que melhoram a qualidade do sono [28], mas também aumento da medicalização de problemas que poderiam ser controlados ou amenizados com medidas não farmacológicas, como a higiene do sono.

Para amenizar e tratar os distúrbios do sono, são realizados tratamentos farmacológicos [29] e não farmacológicos, como terapia comportamental cognitiva, ainda que a associação de ambos é classificada como padrão para insônia [30]. No que concerne ao tratamento farmacológico, os fármacos utilizados incluem hipnóticos, sedativos e antidepressivos [31]. No presente estudo, o uso de medicamentos psicoativos foi relatado por 11,2 % dos interrogados, sendo antidepressivos os mais utilizados. Há uma preferência na prescrição de antidepressivos a sedativos-hipnóticos, uma vez que são mais seguros e possuem efeitos sedativos [32]. Ainda, a depressão, para a qual os antidepressivos são prioritariamente utilizados, está relacionada com as anormalidades no padrão do sono. Enquanto o intuito do antidepressivo é reverter essas anormalidades, pode ocorrer de se comportarem de forma contrária, prejudicando o quadro de sono [33].

De forma contrária ao uso de antidepressivos e medicamentos com efeitos sedativos, estudantes universitários, a fim de manter-se atentos aos estudos, fazem o uso de substâncias psicoestimulantes, como o café [34, 35]. O moderado consumo de café traz benefícios ao nível de atenção [36], entretanto, quando o consumo é elevado, efeitos negativos na qualidade do sono podem ser percebidos [14], o que foi corroborado por esta investigação.

Assim, o consumo elevado de café, identificado em 14,1 % dos estudantes avaliados na presente investigação, pode ser prejudicial, resultando em dificuldades para dormir, e, posteriormente, sonolência e cansaço [37, 38], o que piora o quadro se a ingestão for horas antes de dormir [39]. A dependência de cafeína é correlacionada a uma piora dos distúrbios e da qualidade do sono, seguida de disfunção diurna [40, 41]. A privação de uma adequada noite de sono pode resultar em riscos à saúde do indivíduo, podendo estar associada ao aumento do nível de sofrimento psicológico [42], assim como saúde física e mental, como alterações no desempenho cognitivo [43], surgimento de síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, doença arterial coronariana [44], e alterações no sistema imunológico [45].

Como limitações do estudo, temos as inerentes ao recorte transversal, que não permite o estabelecimento de nexos causais, assim como a baixa taxa de resposta. Por outro lado, como fortaleza, tem-se o fato de ter investigado uma comunidade geral de universitários, e não especificamente um curso ou centro de estudos.

As duas substâncias são utilizadas comumente para melhora dos efeitos negativos consequentes da má qualidade de sono: os medicamentos para possivelmente regular o sono e as comorbidades relacionadas, e o café para melhorar o estado de alerta. Entretanto, os resultados encontrados na presente investigação indicam associação dessas substâncias com a má qualidade do sono, sugerindo que estas substâncias podem estar sendo utilizadas de forma inadequada ou exagerada, mas também que sua utilização

pode ser uma estratégia para minimizar os efeitos deletérios presentes em estudantes com distúrbios do sono. Portanto, a interrelação entre as variáveis avaliadas ficou evidente, indicando importante associação entre o consumo de café e substâncias psicoativas, isoladamente ou não, com a qualidade do sono. Logo, é necessário realizar novos estudos com estudantes universitários, de preferência com delineamento longitudinal, para confirmar as causas específicas da má qualidade de sono e a relação com o uso de substâncias psicoativas e o consumo de café.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os integrantes da equipe do GraduaUEL (Análise da Saúde e Hábitos de Vida dos Estudantes de Graduação da UEL).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. E.M. Lawrence, S. Mollborn, R.A. Hummer, Health lifestyles across the transition to adulthood: Implications for health, *Social Science & Medicine*, **193**, 23-32 (2017).
2. K.M. Graner, A.T. de A.R. Cerqueira, Revisão integrativa: sofrimento psíquico em estudantes universitários e fatores associados, *Ciência & Saúde Coletiva*, **24**, 1327-1346 (2019).
3. M.A. Brondani, M.D. Hollerbach, G.P. Silva, E.R. Pinto, A.S. Corrêa, Depressão em estudantes universitários: fatores de risco e protetivos e sua relação nesse contexto, *Disciplinarum Scientia | Saúde*, **20**, 137-149 (2019).
4. J.M. Twenge, A.B. Cooper, T. E. Joiner, M.E. Duffy, S.G. Binau, Age, period, and cohort trends in mood disorder indicators and suicide-related outcomes in a nationally representative dataset, 2005–2017, *Journal of Abnormal Psychology*, **128**, 185-199 (2019).
5. S.P. Becker, M.A. Jarrett, A.M. Luebbe, A.A. Garner, G.L. Burns, M.J. Kofler, Sleep in a large, multi-university sample of college students: sleep problem prevalence, sex differences, and mental health correlates, *Sleep Health*, **4**, 174-181 (2018).

6. A.I. Almojali, S.A. Almalki, A.S. Alothman, E.M. Masuadi, M.K. Alaqeel, The prevalence and association of stress with sleep quality among medical students, *Journal of Epidemiology and Global Health*, **7**, 169-174 (2017).
7. M. Behzadifar, M. Behzadifar, A. Aryankhesal, H. Ravaghi, H.R. Baradaran, H.S. Sajadi, N.L. Bragazzi, Prevalence of self-medication in university students: systematic review and meta-analysis, *Eastern Mediterranean Health Journal*, **26**, 846-857 (2020).
8. M. dos Santos Maidana, C.L.F. Fernandes, S.C. Dumith, F.M.R. da Silva Júnior, Prevalence and factors associated to the use of illicit drugs and psychotropic medications among brazilian undergraduates, *Acta Scientiarum. Health Sciences*, **42**, e46774 (2020).
9. C.R. Mahoney, G.E. Giles, B.P. Marriott, D.A. Judelson, E.L. Glickman, P.J. Geiselman, H.R. Lieberman, Intake of caffeine from all sources and reasons for use by college students, *Clinical Nutrition*, **38**, 668-675 (2019).
10. B. Murawski, L. Wade, R.C. Plotnikoff, D.R. Lubans, M.J. Duncan, A systematic review and meta-analysis of cognitive and behavioral interventions to improve sleep health in adults without sleep disorders, *Sleep Medicine Reviews*, **40**, 160-169 (2018).
11. J.A. Mitchell, K.H. Morales, A.A. Williamson, N. Huffnagle, A. Ludwick, S.F. Grant, B.A. Zemel, Changes in sleep duration and timing during the middle-to-high school transition, *Journal of Adolescent Health*, **67**, 829-836 (2020).
12. H.L. Morgan, A.F. Petry, P.A.K. Licks, A.O. Ballester, K.N. Teixeira, S.C. Dumith, Consumo de estimulantes cerebrais por estudantes de medicina de uma universidade do extremo sul do Brasil: prevalência, motivação e efeitos percebidos, *Revista Brasileira de Educação Médica*, **41**, 102-109 (2017).
13. R.N. Hughes, N.J. Hancock, Effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in rats chronically exposed to the drug, with some evidence of possible withdrawal-reversal, *Behavioural Brain Research*, **321**, 87-98 (2017).
14. G. Martinez, H. Escãno, M. Sousa, C. Pinto, Impacto do etanol e consumo de café na qualidade de sono de acadêmicos de medicina, *Revista de Medicina*, **97**, 267-272 (2018).
15. S.M.A. Fernandes, *Tratamento farmacológico da insônia: avaliação da qualidade de sites de saúde brasileiros*, Tese de Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018, 73 p.

16. Universidade Estadual de Londrina (UEL), *UEL em dados*, 2017, URL: http://www.uel.br/proplan/novo/pages/arquivos/uel_em_dados/UEL_EM_DADOS_2017.pdf, acesso em 27 abril de 2020.
17. D.J. Buysse, C.F. Reynolds, T.H. Monk, S.R. Berman, D.J. Kupfer, The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research, *Psychiatry Research*, **28**, 193-213 (1989).
18. A.N. Bertolazi, *Tradução, adaptação cultural e validação de dois instrumentos de avaliação do sono: escala de Sonolência de Epworth e Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh*, Tese de mestrado, Programa de pós-graduação em medicina: Ciências Médicas, Rio Grande do Sul, 2008, 93 p.
19. K. Nieber, The impact of coffee on health, *Planta Medica*, **83**, 1256-1263 (2017).
20. World Health Organization (WHO), Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, *Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2018*, Oslo, Norway, 2017.
21. N.F. Moreira, V.G. Luz, C.C. Moreira, R.A. Pereira, R. Sichieri, M.G. Ferreira, A.P. Muraro, P.R.M. Rodrigues, Self-reported weight and height are valid measures to determine weight status: results from the Brazilian National Health Survey (PNS 2013), *Cadernos de Saúde Pública*, **34**(5), e00063917 (2018).
22. I.S. Santos, B.F. Tavares, T.N. Munhoz, L.S.P. de Almeida, N.T.B. da Silva, B.D. Tams, A.M. Patella, A. Matijasevich, Sensibilidade e especificidade do Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) entre adultos da população geral, *Cadernos de Saúde Pública*, **29**, 1533-1543 (2013).
23. A.F. dos Santos, F.C. Mussi, C.G.S. Pires, C.A.S.T. Santos, M.A.S. Paim, Sleep quality and associated factors in nursing undergraduates, *Acta Paulista de Enfermagem*, **33**, eAPE20190144, 1-8 (2020).
24. A.L.L. Vaz, V.O. Gléria, C.F.C. Bastos, I.F. de Souza, A.M.T.C. Silva, R.J. de Almeida, Fatores associados aos níveis de fadiga e sonolência excessiva diurna em estudantes do internato de um curso de medicina, *Revista Brasileira de Educação Médica*, **44**, e011, 1-9 (2020).
25. C.B. de Oliveira, B.C. de Oliveira, L.G.F. Ferreira, Qualidade de sono em universitários de uma instituição privada, *Revista Pesquisa em Fisioterapia*, **10**, 274-281 (2020).

26. A.A. Schlarb, M. Claßen, J. Grünwald, C. Vögele, Sleep disturbances and mental strain in university students: results from an online survey in Luxembourg and Germany, *International Journal of Mental Health Systems*, **11**, 24 (2017).
27. B. Sivertsen, O. Vedaa, A.G. Harvey, N. Glozier, S. Pallesen, L.E. Aarø, K.J. Lønning, M. Hysing, Sleep patterns and insomnia in young adults: a national survey of Norwegian university students, *Journal of Sleep Research*, **28**(2), e12790 (2019).
28. J.S. Albrecht, E.M. Wickwire, A. Vadlamani, S.M. Scharf, S.E. Tom, Trends in insomnia diagnosis and treatment among medicare beneficiaries, 2006-2013, *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, **27**, 301-309 (2019).
29. T.J. Wild, R. MacDonald, M. Brasure, C.M. Olson, M. Carlyle, E. Fuchs, I.S. Khawaja, S. Diem, E. Koffel, J. Ouellette, M. Butler, R.L. Kane, Pharmacologic treatment of insomnia disorder: an evidence report for a clinical practice guideline by the American College of Physicians, *Annals of Internal Medicine*, **165**, 103-112 (2016).
30. Y.F. Molen, L.B.C. Carvalho, L. B.F.D. Prado, G.F.D. Prado, Insomnia: psychological and neurobiological aspects and non-pharmacological treatments, *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, **72**, 63-71 (2014).
31. L.F. Cavadas, L. Ribeiro, Abordagem da insónia secundária do adulto nos cuidados de saúde primários, *Acta Médica Portuguesa*, **24**, 135-144 (2011).
32. F.T.N. Sake, K. Wong, D.J. Bartlett, B. Saini, Insomnia management in the Australian primary care setting, *Behavioral Sleep Medicine*, **17**, 19-30 (2019).
33. A. Wichniak, A. Wierzbicka, W. Jernajczyk, Sleep and antidepressant treatment, *Current Pharmaceutical Design*, **18**, 5802-5817 (2012).
34. V.I. Silveira, R.J.F. Oliveira, M.R. Caixeta, B.B. de P. Andrade, R.G.L. Costa, G.B. Santos, Uso de psicoestimulantes por acadêmicos de medicina de uma universidade do sul de Minas Gerais, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, **13**, 186-192 (2015).
35. L.C. Santana, A.N. Ramos, B.L. de Azevedo, I.L.M. Neves, M.M. Lima, M.V.M. de Oliveira, Consumo de Estimulantes Cerebrais por Estudantes em Instituições de Ensino de Montes Claros/MG, *Revista Brasileira de Educação Médica*, **44**(1), e036 (2020).
36. T.M. Mc Lellan, J.A. Caldwell, H.R. Lieberman, A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **71**, 294-312 (2016).

37. M. Lucas, F. Mirzaei, A. Pan, O. I. Okereke, W. C. Willett, É. J. O'Reilly, K. Koenen, A. Ascherio, Coffee, caffeine, and risk of depression among women, *Archives of Internal Medicine*, **171**, 1571-1578 (2011).
38. L. Wang, X. Shen, Y. Wu, D. Zhang, Coffee and caffeine consumption and depression: A meta-analysis of observational studies, *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, **50**, 228-242 (2016).
39. A.S.C. de Carvalho, A. Fernandes, A.B. Gallego, J.A Vaz, M.S. Vega, Qualidade do sono e consumo de substâncias psicoativas em alunos do ensino secundário do Concelho de Bragança, *Egitania Scientia*, **24**, 47-68 (2019).
40. C. Tavares, R.K. Sakata, Cafeína para o tratamento de dor, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **62**, 387-401 (2012).
41. H.S. Kanyinga, H.A. Hamilton, J.P. Chaput, Sleep duration and consumption of sugar-sweetened beverages and energy drinks among adolescents, *Nutrition*, **48**, 77-81 (2018).
42. R.P. Ogeil, J.G. Phillips, Commonly used stimulants: Sleep problems, dependence and psychological distress, *Drug and Alcohol Dependence*, **153**, 145-151 (2015).
43. M. Erblang, C. Drogou, D. Gomez-Merino, A. Metlaine, A. Boland, J.F. Deleuze, C. Thomas, F. Sauvet, M. Chennaoui, The impact of genetic variations in ADO-RA2A in the association between caffeine consumption and sleep, *Genes*, **10**, 1021 (2019).
44. M.B. Becerra, B.S. Bol, R. Granados, C. Hassija, Sleepless in school: The role of social determinants of sleep health among college students, *Journal of the American College of Health*, **68**, 185-191 (2020).
45. K.A. Honn, J.M. Hinson, P. Whitney, H.P.A. Van Dongen, Cognitive flexibility: A distinct element of performance impairment due to sleep deprivation, *Accident Analysis & Prevention*, **126**, 191-197 (2019).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

K. Petean-Grassi, R. Sirtoli, R. Rodrigues, D. Frizon-Alfieri, C. Molino-Guidoni, G. Frazon de Andrade, E. Giroto, Associação entre o consumo de café e de medicamentos psicoativos e a qualidade do sono de estudantes universitários, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 776-790 (2021).

Sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros: revisión narrativa

María C. García-Cabrera^{1a}, Olga T. Guerron-Morales^{1b}, Juan M. Astaiza-Martínez^{1c}, Carmenza J. Benavides-Melo^{1,2d*}

¹ Departamento de Sanidad Animal, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

² Grupo de Investigación en Medicina Interna y Farmacología Veterinaria (Mifarvet), Departamento de Sanidad Animal, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Correos electrónicos:

^a m.camigarcia@gmail.com

^b Tatianaguerron10@gmail.com

^c astaizajm@gmail.com

* Autor de correspondencia: ^d benavidesmelo@gmail.com

Recibido: 21 de enero de 2021

Revisado: 23 de abril de 2021

Aceptado: 30 de abril de 2021

RESUMEN

Introducción: la marihuana (*Cannabis sativa L.*) es una planta originaria de Asia cada vez más reconocida por su valor terapéutico en la medicina humana y veterinaria. Contiene una gran cantidad de componentes entre los que destacan los fitocannabinoides, de los cuales los más representativos son el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) y Cannabidiol (CBD) que se acoplan respectivamente a los receptores CB1 y CB2 en el sistema endocannabinoide que es un sistema neurotransmisor entre células que regula varios procesos en los vertebrados como memoria, dolor, inflamación, apetito y procesos inmunológicos entre otros. **Objetivo:** realizar una síntesis narrativa del sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros, a partir de la búsqueda de publicaciones en bases de datos electrónica PubMed, NCBI, SciELO, Science Direct, Dialnet, Google y Google Académico. **Resultados:** el CBD es el principal cannabinoide utilizado en la terapia del manejo del dolor en perros por sus propiedades analgésicas y carencia de efectos psicoactivos.

Conclusión: se evidencia la necesidad de realizar más investigaciones con ensayos clínicos controlados sobre el uso terapéutico del cannabidiol, que tengan validez interna y externa, con poblaciones más significativas en la especie de interés.

Palabras clave: caninos, *Cannabis sativa*, nocicepción.

SUMMARY

Endocannabinoid system and cannabidiol in the management of pain in dogs: a narrative review

Introduction: marijuana (*Cannabis sativa* L.) is a plant native to Asia that is increasingly recognized for its therapeutic value in human and veterinary medicine. It contains a large number of components among which the phytocannabinoids stand out, of which the most representative are delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) that are coupled respectively to the CB1 and CB2 receptors in the endocannabinoid system, which is a neurotransmitter system between cells that regulates various processes in vertebrates such as memory, pain, inflammation, appetite and immune processes among others. **Aim:** to carry out a narrative synthesis of the endocannabinoid and cannabidiol system in the management of pain in dogs, from the search of publications in electronic databases PubMed, NCBI, SciELO, Science Direct, Dialnet, Google and Google Scholar. **Results:** CBD is the main cannabinoid used in pain management therapy in dogs due to its analgesic properties and lack of psychoactive effects. **Conclusion:** there is evidence of the need for more research with controlled clinical trials on the therapeutic use of cannabidiol, which have internal and external validity, with more significant populations in the species of interest.

Key-words: Canines, *Cannabis sativa*, nociception.

RESUMO

Sistema endocanabinoide e canabidiol no manejo da dor em cães: uma revisão narrativa

Introdução: a maconha (*Cannabis sativa* L.) é uma planta nativa da Ásia que é cada vez mais reconhecida por seu valor terapêutico na medicina humana e veterinária. Ele contém muitos componentes entre os quais se destacam os fitocanabinóides, dos

quais os mais representativos são delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) e Canabidiol (CBD) que estão acoplados respectivamente aos receptores CB1 e CB2 no sistema endocanabinóide, que é um sistema neurotransmissor entre as células que regula vários processos nos vertebrados, como memória, dor, inflamação, apetite e processos imunológicos, entre outros. **Objetivo:** realizar uma síntese narrativa do sistema endocanabinoide e canabidiol no manejo da dor em cães, a partir da busca de publicações nas bases de dados eletrônicas PubMed, NCBI, SciELO, Science Direct, Dialnet, Google e Google Scholar. **Resultados:** O CBD é o principal canabinoide utilizado na terapia de controle da dor em cães devido às suas propriedades analgésicas e ausência de efeitos psicoativos. **Conclusão:** há evidências da necessidade de mais pesquisas com ensaios clínicos controlados sobre o uso terapêutico do canabidiol, que tenham validade interna e externa, com populações mais significativas nas espécies de interesse.

Palavras-chave: Caninos, *Cannabis sativa*, nocicepção.

INTRODUCCIÓN

Cannabis sativa es una planta que ha acompañado al hombre durante casi toda su historia, se data del año 1500 A.C. en el Rh-Ya de la farmacopea china y se describe como una planta con propiedades curativas en el antiguo texto del Atharvaveda. En la medicina ayurvédica es considerada también como una de sus plantas más importantes. El cannabis medicinal se usó desde ese entonces como analgésico, anticonvulsivo, tranquilizante, anestésico y antiinflamatorios entre otros. Hacia el año 1500 D.C. fue ampliamente conocida en diferentes herbarios de la época, uno de los más destacados de la edad media fue el Old English Herbarium. En esos años el médico y filósofo Paracelso (1493-1541) en su libro *Buch in der Arznei*, mencionó al cannabis como la planta más importante de su época y para los años 1800-1900 en Estados Unidos, fue la era dorada del cannabis medicinal, donde se formuló para diferentes enfermedades y especies. Era el principal analgésico utilizado antes de aparecer la aspirina y los opiáceos [1].

Hoy se sabe que la planta de la marihuana (*Cannabis sativa*) contiene más de 420 constituyentes distintos, de los cuales 61 son cannabinoides, incluidos los fitocannabinoides, sustancias vegetales que estimulan los receptores cannabinoides, entre ellos el Delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), es el más psicoactivo y ciertamente la más famosa de estas sustancias, pero otros cannabinoides como el Canabidiol (CBD) y el Cannabinol (CBN) están ganando interés de los investigadores debido a una variedad de propiedades curativas [2, 3]. El CBD representa casi el 40 % de los extractos que se pueden sacar de la planta, provoca un efecto sedativo que inhibe la transmisión de señales nerviosas asociadas al dolor y se sabe que reduce el crecimiento de las células agresivas de cáncer de mama

en humanos [4]. Durante las últimas décadas, los investigadores probaron el efecto del cannabis medicinal en diferentes cultivos celulares y en diferentes animales experimentales, actualmente está siendo considerada dentro de la farmacología como una medicina efectiva para aliviar diferentes tipos de enfermedades [5, 6].

El sistema endocannabinoide (SEC) está constituido por una red de receptores a nivel celular que se encuentra en todo el cuerpo. La mayoría de estos receptores cannabinoides (CB) se encuentran en el sistema nervioso, pero también existen en piel, huesos y tejido conectivo en general. Estos receptores (CB) están bajo la acción de los endocannabinoides sintetizados en el cuerpo y de esta forma, participan en un proceso de comunicación llamada neurotransmisión, el cual involucra a casi todo el organismo con el objetivo de lograr la homeostasis en casi todos los procesos metabólicos del organismo [3].

Hasta la fecha se han identificado dos tipos de receptores cannabinoides, los CB1 y los CB2. Se diferencian en el modo de transmitir la señal y en su distribución en los diferentes tejidos. La activación de los receptores CB1 da lugar a los típicos efectos sobre la circulación y la psique conocidos tras el consumo de cannabis, mientras que la de los CB2 no los produce. Los CB1 se encuentran principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal [7].

El cannabidiol actúa disminuyendo las señales de percepción del dolor, entendiendo que este comienza cuando un estímulo es capturado y traducido por el sistema sensorial y las señales aferentes de los nociceptores, estas son transportadas al sistema nervioso central por dos tipos de fibras sensoriales primarias: fibras A-delta y fibras C no mielinizadas, en donde el fenómeno de hiperalgesia primaria se explica satisfactoriamente por mecanismos sensibilizadores que ocurren en la periferia, mientras que los fenómenos de hiperalgesia secundaria dependen fundamentalmente de mecanismos sensibilizadores de origen central. Hasta la fecha se conocen muchos estudios sobre los usos terapéuticos de la marihuana para el manejo del dolor en seres humanos y hoy en día este tema ha empezado a generar especial interés en la medicina veterinaria para esta función [8, 9].

METODOLOGÍA

Para la cumplir el objetivo de este artículo se realizó una revisión de publicaciones incluyendo: textos médicos, artículos científicos, tesis, opiniones de expertos, videos o guías del tema con registro del sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros sin límite temporal de publicación.

La búsqueda se efectuó desde marzo a octubre de 2020 limitando el idioma a inglés, portugués y español, en las bases de datos electrónicas PubMed, NCBI, SciELO, Science Direct, Dialnet, Google y Google Académico. Los descriptores utilizados fueron: perros, caninos, marihuana, *Cannabis sativa*, terapéutica, cannabidiol, CBD y dolor. Se utilizaron conectores OR, AND y NOT. Adicionalmente, se realizó una búsqueda inversa a partir de las referencias bibliográficas de los estudios seleccionados.

RESULTADOS

Se revisaron un total de 109 documentos, de los cuales 9 (junto con 2 videos) cumplieron con los criterios de inclusión (tabla 1).

Tabla 1. Características de las publicaciones seleccionadas

Autor y año	Título	Tipo de publicación/diseño
Samara E., Bialer M., Mechoulam R. (1988) [10]	<i>Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs</i>	Original/ensayo clínico
Dall'Aglio C., Mercati F., Pascucci L., Boiti C., Pedini V., Ceccarelli P. (2010) [11]	<i>Immunohistochemical localization of CB1 receptor in canine salivary glands</i>	Original/descriptivo
Campora L., Miragliotta V., Ricci E., Cristino L., Biol D., Marzo V. Di, et al. (2012) [12]	<i>Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis</i>	Original/descriptivo
Mercati F., Dall'Aglio C., Pascucci L., Boiti C., Ceccarelli P. (2012) [13]	<i>Identification of cannabinoid type 1 receptor in dog hair follicles</i>	Original/descriptivo
Pirone A., Lenzi C., Coli A., Giannessi E., Stornelli M.R., Miragliotta V. (2015) [14]	<i>Preferential epithelial expression of type-1 cannabinoid receptor (CB1R) in the developing canine embryo</i>	Original/descriptivo
Freundt-Revilla J., Kegler K., Baumgärtner W., Tipold A. (2017). [15]	<i>Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system</i>	Original/descriptivo
Gamble L.-J., Boesch J.M., Frye C.W., Schwark W.S., Mann S., Wolfe L., et al. (2018) [16]	<i>Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs</i>	Original/ensayo clínico
Silver R.J. (2019) [17]	<i>The Endocannabinoid System of Animals</i>	Revisión
Betancurt J.J. (2019) [1]	<i>Cannabis Medicinal En Veterinaria. - Modulación Del Sistema Endocannabinoide</i>	Video/opinión de expertos
Pons A. (2020) [18]	<i>Cannabis en veterinaria. Dolor en perros y gatos</i>	Webinar
Kogan L.R., Downing R. (2020) [19]	<i>The Use of Cannabidiol-Rich Hemp Oil Extract to Treat Canine Osteoarthritis-Related Pain : A Pilot Study</i>	Original/ensayo clínico

Los cannabinoides

Los cannabinoides son sustancias químicas que actúan principalmente sobre receptores cannabinoides específicos y se dividen básicamente en tres grupos: cannabinoides endógenos (endocannabinoides), cannabinoides a base de hierbas (fitocannabinoides) y cannabinoides sintéticos [20].

Los endocannabinoides se forman de forma endógena a partir de fosfolípidos de membrana en respuesta a aumentos en el calcio intracelular; se liberan de inmediato y actúan como ligandos de receptores cannabinoides [21].

Los fitocannabinoides son sustancias químicas producidas especialmente por plantas femeninas de *Cannabis sativa* y están presentes en la resina de la hierba. Se ha encontrado que estas plantas contienen más de 100 fitocannabinoides [22].

Los cannabinoides sintéticos son compuestos fabricados que se unen a los receptores de cannabinoides (con actividad agonista o antagonista) y muchos de ellos se sintetizaron originalmente con fines de investigación [23].

Existen muchos componentes bioquímicos en el cannabis con valor medicinal, dentro de estos los de mayor interés son los fitocannabinoides, un grupo de más de 100 compuestos terpenofenólicos, que se encuentran principalmente en la planta *Cannabis sativa* [24], como el THC, con cualidades psicoactivas y el CBD que tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas, sin efectos psicoactivos [7].

El sistema endocanabinoide

Encontrado en casi todos los animales, desde los mamíferos hasta los phyla más primitivos como Cnidaria, la aparición temprana del sistema endocanabinoide en la evolución de Phyla, indica su importancia biológica. Se ha descubierto que todos los animales, incluidos los vertebrados (mamíferos, aves, reptiles y peces) e invertebrados (erizos de mar, sanguijuelas, mejillones, nemátodos y otros) tienen sistemas endocannabinoides [17].

Los estudios del Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas en Bethesda, Maryland, clonaron el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) en 1990, que es el objetivo de los ligandos cannabinoides endógenos, y lo llamaron receptor canabinoide 1 (CB1 o CBR1). Este receptor pertenece a la familia de GPCR de clase A similar a la rodopsina [17, 25]. Unos años más tarde, se clonó el segundo GPCR: receptor canabinoide 2 (CB2 o CBR2) [17, 26].

El receptor CB1, como miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), se clasifica como un receptor similar a la rodopsina de clase A. Anatómicamente, el sistema nervioso central es su locus principal, con altas concentraciones en

la corteza, el hipocampo, la salida de los ganglios basales y el cerebelo. Las diferencias entre especies e interespecies son comunes en términos de los sitios anatómicos y la densidad de los receptores de cannabinoides. Estos receptores, en los seres humanos no se encuentran en ningún grado en el tronco del encéfalo o el bulbo raquídeo, que controlan funciones autónomas vitales como la respiración y la frecuencia cardíaca, razón por la cual se aumenta el perfil de seguridad de los cannabinoides [17, 27].

El sistema endocannabinoide se divide en las tres categorías: 1. Ligandos endógenos o endocannabinoides. 2. Receptores de membrana. 3. Desactivación de enzimas [17].

Tras el descubrimiento de los receptores de membrana que aceptan ligandos de origen vegetal, los investigadores identificaron rápidamente los ligandos endógenos que se unen a los receptores de cannabinoides (CBR). Estos ligandos endógenos son los endocannabinoides (eCB), araquidonoiletanolamida (AEA), una amida de ácido graso de cadena larga, que Mechoulam denominó anandamida en 1992. *Ananda* en sánscrito significa felicidad. Este endocannabinoide genera sentimientos de bienestar y, desde su descubrimiento, ahora se considera la “molécula de la felicidad” responsable de la “euforia del corredor” que describen muchos atletas. El éster de esta amida de ácido graso, 2-araquidonoil glicerol (2-AG), se descubrió en 1995 [17, 28-30].

Los eCB son producidos ad hoc por enzimas localizadas en la membrana celular estimuladas por la elevación intracelular de iones calcio secundario a la despolarización neuronal. El nivel constitutivo de endocannabinoides se denomina “tono endocannabinoide” y ese nivel varía según el tejido específico en el que se encuentran. Estos niveles dependen de su tasa de producción menos la tasa de degradación enzimática. La amida hidrolasa de ácido graso (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las enzimas específicas involucradas en la modulación del tono endocannabinoide. AEA y 2-AG, que son los dos endocannabinoides, son metabolizados enzimáticamente por FAAH y MAGL, respectivamente. La FAAH también puede metabolizar el 2-AG, aunque en menor medida [17].

Un mecanismo de proteína de transporte retrógrado transporta los eCB desde las membranas celulares postsinápticas para unirse a los receptores cannabinoides (CBR) que se encuentran en la membrana presináptica. Este mecanismo de transporte luego devuelve los eCB a la membrana postsináptica donde son degradados por las enzimas FAAH o MAGL, para anandamida y 2-AG [17, 23].

Los endocannabinoides actúan sobre los receptores endocannabinoides presinápticos después de su liberación de la membrana neuronal postsináptica. Los eCB modulan la liberación de neurotransmisores al inhibir la entrada de calcio intracelular que, a su vez, inhibe la liberación de neurotransmisores. Los eCB se recaptan rápidamente y luego se

catabolizan muy rápidamente, lo que resulta en una vida media muy corta. Los eCB se producen ad hoc después de ser estimulados por un traumatismo o por grandes cantidades de despolarización de las células nerviosas. La producción de eCB se produce localmente en la membrana celular e influye principalmente en el tejido contiguo. Los eCB tienen una actividad bastante breve. Están sujetos a una rápida recaptación por parte de la célula y luego son degradados por enzimas que forman parte del sistema endocannabinoide. Otro mecanismo transportador endocannabinoide lleva los eCB al interior de la célula donde se acumula y, posteriormente, conduce a su degradación enzimática [17, 31, 32].

Localización anatómica de los receptores CB1

En los perros la localización anatómica del receptor CB1 en el sistema nervioso canino normal se ha determinado mediante el uso de análisis inmunohistoquímicos. Actualmente, se están realizando estudios utilizando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) más precisa, pero esos datos aún no están publicados. Se evaluaron post mortem los sistemas nerviosos de perros sanos a los 4 meses, 6 meses y perros de 10 años. Se encontró que los neutrófilos de la corteza cerebral, cornu ammonis (CA), la circunvolución dentada del hipocampo, el mesencéfalo, el cerebelo, el bulbo raquídeo y la materia gris de la médula espinal tenían una fuerte inmunorreactividad. Se encontró una expresión densa de CB1 en las fibras del globo pálido y la sustancia negra, basada en la inmunorreactividad de CB1. Estas localizaciones inmunorreactivas estaban rodeadas de neuronas sin inmunorreactividad [15, 17].

Se registró un hallazgo consistente de inmunorreactividad positiva en astrocitos en todas las regiones examinadas. En el sistema nervioso periférico, la tinción CB1 se localizó en las neuronas y en las células satélite de las células de Schwann mielinizantes y los ganglios de la raíz dorsal.

Al comparar el sistema nervioso de los perros más jóvenes con el sistema nervioso de los perros mayores, se encontró una menor expresión de CB1 en el tejido cerebral. Esto fue menor que la expresión de la inmunohistoquímica del receptor que se encuentra en el tejido cerebral fetal y neonatal humano. Se ha medido la expresión reducida del receptor en ratas envejecidas, localizadas en el cerebelo, la corteza cerebral y los ganglios basales y presentes, pero menos prevalentes en el hipocampo. También se encontró en este estudio que el perro de mayor edad, al igual que las ratas mayores, tenía medidas reducidas de la expresión del receptor CB1 en comparación con los sistemas nerviosos de los perros más jóvenes examinados [24]. Los receptores CB1 en las glándulas salivales [11], los folículos pilosos [12], la piel y el hipocampo en perros se han descrito previamente [13, 17].

Cuando se examinó un embrión canino de 30 días utilizando inmunohistoquímica para localizar sus receptores CB1, se identificó inmunorreactividad principalmente en los tejidos epiteliales e incluyó la mayoría de las estructuras del sistema nervioso central y periférico, el oído interno, el epitelio olfatorio y las estructuras relacionadas, los ojos y la glándula tiroides [14, 17].

Localización anatómica de los receptores CB2

Se localizan principalmente en el SNP y no son psicotrópicos. Está involucrado en la reducción de la inflamación y el alivio del dolor crónico. La activación inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y la posterior liberación de citocinas antiinflamatorias [33].

El receptor cannabinoide 2 se ha encontrado principalmente en células del sistema inmunológico y en el bazo y las amígdalas [34]. Los receptores CB1 y CB2 son estructuralmente bastante similares, a pesar de sus diferentes ubicaciones anatómicas en los sistemas nervioso central e inmunológico, respectivamente.

Los receptores CB2 del sistema inmunológico pueden modular la liberación de citocinas. La inhibición de la adenilciclasa se debe a la activación de los receptores CB2 de los linfocitos por los cannabinoides. Esto, a su vez, puede reducir las respuestas celulares y humorales a un desafío inmunológico [35]. Los receptores CB1 y CB2 disminuirán la actividad de la adenilciclasa y regularán negativamente la vía del cAMP. Otros resultados de la activación de linfocitos incluyen cascadas de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), modulación de canales iónicos y modificación de los niveles de calcio intracelular, lo que conduce a la liberación de neurotransmisores [17, 36-39]. Además de los niveles de calcio intracelular, la activación de los canales de potasio también es un mecanismo de señalización para el receptor CB2 [17, 40].

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son necesarias para transportar endocannabinoides a la célula donde se unen a los receptores de cannabinoides en la membrana mitocondrial externa. Estos receptores mitocondriales dan como resultado dos mecanismos: 1. Reclutan factores de transcripción nuclear para alterar la expresión génica [41] y 2. Regulan el metabolismo de las neuronas [42]. La proteína 1a que interactúa con el receptor de cannabinoides (CRIP1a) inhibe la señalización tónica (constitutiva) de eCB [43]. Estos receptores CB1 mitocondriales alteran el metabolismo energético de la célula al reducir la actividad en la cadena de transporte de electrones y mediante la inhibición de la adenilciclasa soluble. Los receptores mitocondriales liberan ceramida, que juega un papel en la creación de estrés en el retículo endoplásmico

(RE) en las células cancerosas y conduce a la autofagia y potencialmente a la apoptosis y muerte celular [44].

Se encuentra una distribución homogénea de los receptores CB1 y CB2 en perros clínicamente normales en todas las capas de la epidermis. En la epidermis humana, el receptor CB1 se localizó en las capas epidérmicas espinoso y granuloso, y el receptor CB2 se identificó en los queratinocitos basales. Los receptores CB1 y CB2 están presentes tanto en la epidermis del perro sano como en perros con dermatitis atópica. Existe una diferencia anatómica básica entre la arquitectura epidérmica humana y canina, con la epidermis canina que contiene de dos a tres capas de células nucleadas, mientras que la epidermis humana contiene de seis a siete capas de células nucleadas. Los perros diagnosticados con dermatitis atópica tienen una epidermis hiperplásica. Los queratinocitos suprabasales poseen una fuerte inmunorreactividad para los receptores CB1 y CB2, mientras que había una débil inmunorreactividad CB1 pero fuerte CB2 en los queratinocitos basales. Esta es una fuerte indicación de que estos receptores se regulan positivamente durante la inflamación epidérmica. Se ha descubierto que los agonistas de los receptores CB1 y CB2 reducen la desgranulación de los mastocitos, que es un paso importante en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad [17].

El receptor CB2 canino en la epidermis se encuentra localizado en el citoplasma celular de la capa basal y suprabasal, folículos pilosos (células basales y suprabasales y vainas radiculares epiteliales externas e internas), músculos piloerectores, glándulas sudoríparas (células secretoras y ductales), glándulas sebáceas, mastocitos, fibroblastos y células endoteliales, ganglios linfáticos (fuerte inmunorreactividad de la zona de células B, principalmente en los centros terminales de folículos secundarios); encontrándose regulado al alza en la dermatitis atópica [12].

También se ha demostrado que los endocannabinoides actúan sobre los receptores TRPV1 (canal catiónico potencial receptor transitorio subfamilia V miembro 1, también conocido como “receptor de capsaicina” y “receptor vanilloide” 1) [45]. Además, se ha sugerido la existencia de otros receptores de cannabinoides acoplados a proteína G. Estos receptores propuestos (también llamados receptores cannabinoides putativos o no clásicos) incluyen GPR18, GPR55 y GPR119 que tienen similitud estructural con CB1 y CB2 [23, 46, 47].

Aunque CB1 y CB2 son los receptores más prevalentes en el sistema endocannabinoide, TRPV1 puede ser de gran importancia cuando se activa por la anandamida y puede desempeñar funciones en los trastornos motores; protección para los oídos/piel; protección de las mucosas de los tractos gastrointestinal, urinario, respiratorio y circulatorio; y puede afectar procesos cognitivos como la emoción, el aprendizaje y la saciedad [33].

Cannabidiol en caninos

Farmacocinética

Samara E. *et al.* en 1988 decidieron investigar la farmacocinética del CBD en perros, cada perro recibió, en momentos separados y en un diseño cruzado, inyecciones intravenosas de CBD (45 o 90 mg en 1,5 ml de alcohol al 70%) en la vena cefálica y una cápsula de gelatina oral que contenía 180 mg de CBD. En los resultados obtuvieron que después de las dos administraciones IV hubo una rápida disminución inicial de los niveles plasmáticos de CBD seguida de una eliminación prolongada, con una semivida media de 7 a 9 horas. Además, se indicó que las células sanguíneas y/o el plasma no se encuentran entre los sitios metabólicos del CBD. El CBD, como el THC, es un fármaco altamente lipofílico y su solubilidad en agua está en el rango de solo varios miligramos por litro, esta baja solubilidad en agua puede provocar una absorción incompleta. Además, como el THC es inestable a un pH gástrico ácido, puede ocurrir un fenómeno similar con el CBD. La baja disponibilidad sistémica de CBD tras la administración oral puede deberse a un efecto de primer paso y absorción incompleta [10].

En 2018 Bartner *et al.*, mediante un estudio, determinaron la farmacocinética del cannabidiol (CBD) en 30 perros sanos que recibieron 1 de 3 formulaciones (perlas de aceite microencapsuladas orales, aceite oral infundido con CBD o crema transdérmica infundida con CBD), a una dosis de 75 o 150 mg cada 12 h durante 6 semanas. En los resultados se obtuvo que la exposición es proporcional a la dosis y el aceite con infusión de CBD oral proporciona el perfil farmacocinético más favorable [48].

También en el 2018 Gamble *et al.* realizaron un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, propietario y veterinario, crossover. Cada perro recibió CBD, 2 mg/kg oral cada 12 h, o placebo cada 12 h. La farmacocinética reveló una vida media de eliminación de 4,2 h a dosis de 2 mg/kg oral y sin efectos secundarios observables. La evaluación veterinaria mostró disminución del dolor durante el tratamiento con CBD. Los propietarios no notificaron efectos secundarios, aunque la química sérica mostró un aumento en la fosfatasa alcalina durante el tratamiento con CBD [16].

Usos generales

- En enfermedades autoinmunes (tratamiento con CBD): mielopatía degenerativa canina, lupus eritematoso sistémico y discoide, pénfigo vulgar o foliáceo, enfermedad hepática autoinmune, dermatitis atópica, inmunodeficiencia felina.
- En enfermedades neurodegenerativas (tratamiento con fitofármacos o aceites ricos en THC).

- En enfermedades desmielinizantes.
- Para efecto antitumoral para algunos tipos de cáncer (de acuerdo con el cáncer, tratamiento con aceites ricos en THC o CBD o aceites equilibrados): paliativo del dolor oncológico, disminución de síntomas de la quimioterapia, mejoría en calidad de vida, mejoría en el consumo de alimento, mejoría en las horas de sueño y descanso de los animales.
- En epilepsia (tratamiento con CBD): muchas veces relacionada a pacientes muy ansiosos o estresados, ansiedad de separación, ruidos muy fuertes en épocas decembrinas.
- En artritis/artrosis: tanto para el dolor como para disminuir la inflamación. Aquí el cannabis se puede usar de forma crónica sin los efectos secundarios que puedan tener algunos Aines y esteroides.
- En fracturas y tratamientos ortopédicos para regeneración ósea y nerviosa.
- En enfermedades crónicas con alto uso de glucocorticoides o antibióticos.
- En pacientes geriátricos.
- En síndrome de ansiedad por separación.
- Mascotas agresivas o temerosas.
- En pérdida del apetito.
- En glaucoma, para disminución de la presión intraocular.
- En hiperqueratosis, entre otras [1].

Uso en el manejo del dolor y sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide inhibe la transmisión nociceptiva ascendente, activa la vía inhibitoria descendente y modifica el componente emocional del dolor mediante la regulación de distintos neurotransmisores (serotonina, dopamina, GABA, acetilcolina, histamina, prostaglandinas, péptidos opioides). El sistema endocannabinoide interactúa con otros sistemas en el control del dolor como son el opioide, el receptor Vanilloide (TRPV) y el paracetamol.

Con el sistema opioide tiene sinergia, ya que la organización de los receptores de ambos sistemas es similar a lo que ocurre entre el SNC y SNP. La inflamación provoca la extravasación de linfocitos y la llegada de macrófagos, produciéndose una demanda de

endocannabinoides que se unen a receptores CB2 de mastocitos, esto impide la liberación de sustancias proinflamatorias y pronociceptivas

Con el sistema receptor Vallinoide (TRPV), la anandamida actúa en el receptor TRPV1 para el control del dolor neuropático e inflamación. Adicionalmente, la capsaicina es agonista del receptor TRPV1 y produce una excitación inicial (ejemplo, quemazón) en las neuronas de primer orden y después una desensibilización en este tipo de neuronas y una reducción de la respuesta al receptor TRPV1.

La interacción que se da entre el sistema endocannabinoide y paracetamol tiene un efecto antihiperalgésico a través de los receptores CB1 y los receptores TRPV1 [18].

¿Qué tipos de dolor se pueden tratar con cannabinoides?

En los últimos años, la investigación científica ha enfatizado el estudio de *Cannabis sativa*, una planta muy popular por sus propiedades medicinales durante siglos, pero que solo recientemente comenzó a ser prescrita para el dolor después del descubrimiento de receptores endógenos cannabinoides [49].

Dolor osteoartrosico

En el 2020, Kogan y Downing realizaron un ensayo clínico piloto de 90 días para evaluar el impacto de un producto de espectro completo que contenía extracto de cáñamo y aceite de semilla de cáñamo en perros con dolor crónico de mala adaptación. Se concluyó que la adición de un aceite de CBD derivado de cáñamo parece afectar positivamente a los perros con dolor crónico desadaptativo al disminuir su dolor, mejorando así su movilidad y calidad de vida. La reducción de la dosis de gabapentina puede ser el resultado de cambios en la analgesia y/o sedación con la adición del extracto de aceite de cáñamo [19].

Dolor neuropático

En Australia, Casey *et al.* realizaron un estudio en ratones con dolor crónico neuropático inducido, donde evaluaron la interacción con los fitocannabinoides THC y CBD para el alivio del dolor. Mostraron que los efectos secundarios (incoordinación motora, catalepsia y sedación) producidos por la administración de THC solo desaparecieron al combinarlo con dosis bajas de CBD. Propusieron que la coadministración de THC: CBD a dosis bajas mejoró sinérgicamente los efectos analgésicos del THC para este modelo [50].

En 2007 Costa *et al.* demostraron el potencial terapéutico del cannabidiol cuando es administrado por vía oral, en el tratamiento del dolor neuropático (en casos de compresión del nervio ciático) a dosis de 2,5-20 mg/kg y también en el dolor inflamatorio en ratas a dosis de 20 mg/kg. Ambos tratamientos mostraron una reducción de la hiperal-

gesia asociada con el daño tisular, demostrando la acción de activación del CBD sobre los receptores vaniloides (TRPV1), además de altos niveles de anandamida extracelular que pueden estar relacionados con el efecto antihiperalgésico y antiinflamatorio además, no se observaron efectos psicoactivos [51, 52].

Dolor oncológico

Aunque los datos sobre la aparición y la intensidad del dolor oncológico en los animales de compañía son escasos, Yasbeck y Fantoni en 2003 informaron que 83% de los perros con neoplasias presentan dolor moderado según lo informado por los propietarios.

Según Antunes *et al.* en 2008, en más del 60% de los pacientes veterinarios diagnosticados con cáncer el dolor se debe a metástasis, infiltración de tumores óseos, compresión nerviosa o crecimiento neoplásico extenso que involucra tejidos adyacentes.

De igual forma el dolor puede asociarse a terapias como la amputación de un miembro en pacientes con osteosarcoma y neuropatía periférica desencadenada por quimioterapia con derivados del platino (cisplatino, carboplatino) y alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), se cree que estos pacientes también pueden beneficiarse del uso de esta modalidad terapéutica, que mejoraría el bienestar y calidad de vida de estos animales disminuyendo la gravedad de los síntomas que las terapias actualmente disponibles no pueden controlar [49, 53].

DISCUSIÓN

La mayoría de información disponible se centra en estudios toxicológicos y actividad psicoactiva de la marihuana y sus derivados en humanos, y en menor proporción se encuentran estudios veterinarios en perros sobre farmacocinética y propiedades terapéuticas de los componentes de *Cannabis sativa* como el Cannabidiol.

Los estudios científicos validados sobre los efectos del cannabis en animales han sido estudios preclínicos y llevados a cabo en “animales de laboratorio”, se conocen muy pocos de estos estudios en perros, gatos, conejos y hurones. Por otra parte, existe un número aún menor de investigaciones fiables sobre el uso clínico de cannabinoides en cualquier tipo de animales [54]. Muchos de los estudios conocidos tampoco proporcionan un análisis sistemático de dosis-respuesta de las acciones antialodínicas y efectos secundarios de los fitocannabinoides, esto es importante porque proporciona información sobre la eficacia y la ventana terapéutica de los cannabinoides, los cuales son factores importantes en su uso clínico, por ahora mucha de la información que se encuentra disponible se basa en experiencias personales de profesionales veterinarios, por lo que no se puede contemplar como una fuente fiable de información.

La *Cannabis sativa* es una opción terapéutica frente al manejo del dolor en la medida que se realicen más estudios con validez interna y externa en la especie de interés, por esto que se sugiere orientar estudios controlados con una población más homogénea y significativa de la especie canina, para obtener información más contundente sobre su verdadero valor terapéutico al mismo tiempo que se debe investigar por sus posibles efectos adversos, secundarios e interacciones como la combinación de agentes cannabinoides y opioides, los cuales prometen ser una buena opción terapéutica, en donde parece existir sinergismo farmacológico entre estas sustancias, reduciendo así las dosis utilizadas sin perjuicio del efecto terapéutico, además de reducir significativamente sus efectos adversos. En general, los opioides se eligen en la rutina veterinaria para el tratamiento del dolor agudo en pequeños animales, debido a su alta eficacia y posible reversibilidad. Los opioides y cannabinoides promueven la antinocicepción a través de acción sobre las proteínas G acopladas y estudios ya han informado sobre el uso de cannabinoides modificados que pueden tener una potencia analgésica entre 200 y 6000 veces mayor a la morfina y otros analgésicos [52, 56-59]. Además, aunque se ha propuesto que los nabiximols (derivados farmacéuticos del cannabis) podrían ofrecer una alternativa sinérgica superior a los componentes individuales del cannabis, la información hasta la fecha evaluada no proporciona información sobre sus acciones en los modelos de dolor neuropático. Por lo tanto, la base preclínica para el uso de fitocannabinoides específicos en estados de dolor neuropático, ya sea solos o en combinación, sigue sin estar clara [50, 55].

Por último, es importante recalcar que no se debe extrapolar información de humanos a animales por las diferencias entre especies, principalmente en la ubicación anatómica de los receptores cannabinoides en el sistema endocannabinoide. Por ejemplo, el receptor CB1 en los seres humanos no prevalece en el tronco encefálico o en el bulbo raquídeo, los órganos responsables de controlar las funciones autónomas vitales como la respiración y los latidos del corazón. Este es un factor que contribuye en gran medida al perfil de seguridad de los cannabinoides en humanos y la razón principal por la que es casi imposible sufrir una sobredosis de THC. Sin embargo, para los perros esto no es cierto [27].

CONCLUSIÓN

La información disponible sobre los cannabinoides en perros es limitada, pero promisoría, ya que se requieren más estudios para establecer los parámetros farmacocinéticos en esta especie y se debe tener en cuenta este grupo farmacológico para el manejo del dolor ya sea de manera individual o como analgesia multimodal.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. J. Betancurt, *Cannabis Medicinal en Veterinaria. - Modulación del sistema endocannabinoide*, URL: <https://www.youtube.com/watch?v=9aNVZdJhO58&t=4054s>, consultado en octubre de 2020.
2. J.R. Albaine-Pons, Biología de *Cannabis sativa* (Marihuana): efectos sobre animales de laboratorio, *Ciencia y Sociedad*, **10**, 399-411 (1985).
3. A.I. Moiron, Sistema endocannabinoide: virtudes de una función poco conocida en el organismo animal, *Selecciones Veterinarias*, **28**(26), 1-8 (2020).
4. M. Hinojosa-Becerra, I. Marín-Gutierrez, El descubrimiento del cannabidiol, el principal componente del cannabis, *Cannabis Magazine*, 99-105 (2017).
5. J. Osorio, H. Tangarife, Cannabis, una opción terapéutica, *Biosalud*, **8**, 166-177 (2009).
6. S. Barbagallo, S. Finocchiaro, M. Ahmadi, Veterinary medical use of cannabis, cannabinoid receptors and endocannabinoid system in mammals, *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, **52**(1), 5-13 (2019).
7. F. Grotenhermen, Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide, *Cannabinoids*, **1**(1), 10-14 (2006).
8. A.A. Fernandes de Souza, A.F. Mendes da Silva, T.F. Silva, C.R. Oliveira, *Cannabis sativa* - Uso de fitocannabinoides para o tratamento da dor crônica, *Braz. J. Nat. Sci.*, **1**(2), 1-12 (2019).
9. C.A. Morales-Vallecilla, *Bases para el manejo del dolor en perros y gatos*, Facultad de Ciencias, Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2016, URL: [http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/5567/8/Morales-VallecillaCarlos Arturo_2016_manejo_dolor_perros_gatos.pdf](http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/5567/8/Morales-VallecillaCarlos%20Arturo_2016_manejo_dolor_perros_gatos.pdf), consultado en abril de 2020.

10. E. Samara, M. Bialer, R. Mechoulam, Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs, *Drug Metab. Dispos.*, **16**(3), 469-472 (1988).
11. C. Dall'Aglio, F. Mercati, L. Pascucci, C. Boiti, V. Pedini, P. Ceccarelli, Immunohistochemical localization of CB1 receptor in canine salivary glands, *Vet. Res. Commun.*, **34**(Suppl. 1), S9-S12 (2010).
12. L. Campora, V. Miragliotta, E. Ricci, L. Cristino, D. Biol, V Di Marzo, *et al.*, Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis, *Am. J. Vet. Res.*, **73**(7), 988-995 (2012).
13. F. Mercati, C. Dall'Aglio, L. Pascucci, C. Boiti, P. Ceccarelli, Identification of cannabinoid type 1 receptor in dog hair follicles, *Acta Histochem.*, **114**(1), 68-71 (2012).
14. A. Pirone, C. Lenzi, A. Coli, E. Giannessi, M.R. Stornelli, V. Miragliotta, Preferential epithelial expression of type-1 cannabinoid receptor (CB1R) in the developing canine embryo, *Springerplus*, **4**, 1 (2015).
15. J. Freundt-Revilla, K. Kegler, W. Baumgärtner, A. Tipold, Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system, *PLoS One*, **181064**, 21 p (2017).
16. L.J. Gamble, J.M. Boesch, C.W. Frye, W.S. Schwark, S. Mann, L. Wolfe, *et al.*, Pharmacokinetics, safety, and clinical efficacy of cannabidiol treatment in osteoarthritic dogs, *Front. Vet. Sci.*, **5**, 165 (2018).
17. R.J. Silver, The endocannabinoid system of animals, *Animals*, **9**(9), 686 (2019).
18. A. Pons, *Webinar cannabis en veterinaria. Dolor en perros y gatos*, URL: <https://www.youtube.com/watch?v=5Q-kteCzuDg&t=2221s>, consultado en septiembre de 2020.
19. L.R. Kogan, R. Downing, The use of cannabidiol-rich hemp oil extract to treat canine osteoarthritis-related pain: A pilot study, *Am. Holist. Vet. Med. Assoc.*, **58**(Spring), 35-45 (2020).
20. Z. Fišar, Phytocannabinoids and endocannabinoids, *Encycl. Psychopharmacol.*, **2**(1), 51-75 (2009).
21. L.K. Miller, L.A. Devi, The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: Mechanisms and their therapeutic implications, *Pharmacol. Rev.*, **63**(3), 461-470 (2011).
22. A.J. Hill, C.M. Williams, B.J. Whalley, G.J. Stephens, Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders, *Pharmacol. Ther.*, **133**(1), 79-97 (2012).

23. L. Landa, A. Sulcova, P. Gbelec, The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: A review, *Vet. Med. (Praha)*, **61**(3), 111-122 (2016).
24. R.R. Santisteban-Arenas, J.J. Betancurt, *Perfiles fitocannabinoides en cannabis medicinal veterinario: ¿qué es y por qué debe importar? Remevet- Edición especial VETCANN I-2020*, URL: <https://www.researchgate.net/publication/343836447%0APERFILES>, consultado en septiembre de 2020.
25. L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.I. Bonner, Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature*, **346**(6284), 561-564 (1990).
26. S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, **365**, 61-65 (1993).
27. R. Silver, J.A. Hartsel, K. Boyar, A. Pham, A. Makriyannis, Cannabis in veterinary medicine: Cannabinoid therapies for animals, en: R.C. Gupta, A. Srivastava, R. Lall (editores), *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, Springer, 2019, p. 121-155.
28. W. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. Pertwee, L. Stevenson, G. Griffin, *et al.*, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science*, **258**(5090), 1946-1949 (1992).
29. R. Mechoulam, S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, A.R. Schatz, *et al.*, Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem. Pharmacol.*, **50**(1), 83-90 (1995).
30. R.G. Pertwee, Cannabinoid receptor ligands: Clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **9**(7), 1553-1571 (2000).
31. N.M. Kogan, R. Mechoulam, The chemistry of endocannabinoids, *J. Endocrinol. Invest.*, **259**(Suppl. 3), 3-14 (2006).
32. B. Basavarajappa, Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity, *Curr. Neuropharmacol.*, **5**(2), 81-97 (2007).
33. A. Brutlag, H. Hommerding, Toxicology of marijuana, synthetic cannabinoids, and cannabidiol in dogs and cats, *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.*, **48**(6), 1087-1102 (2018).

34. R.G. Pertwee, Cannabinoid receptors and pain, *Prog. Neurobiol.*, **63**(5), 569-611 (2001).
35. R. Condie, A. Herring, W.S. Koh, M. Lee, N.E Kaminski, Cannabinoid inhibition of adenylyl cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2, *J. Biol. Chem.*, **271**(22), 13175-13183 (1996).
36. A.C. Howlett, Cannabinoid inhibition of adenylyl cyclase: Relative activity of constituents and metabolites of marihuana, *Neuropharmacology*, **26**(5), 507-512 (1987).
37. A.C. Howlett, The cannabinoid receptors, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68-69**, 619-631 (2002).
38. J.P. Marcu, J.B. Schechter, Molecular pharmacology of CB1 and CB2 cannabinoid receptors, en: V.R. Preedy (editor), *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*, Academic Press (Elsevier), New York, 2016, p. 713-721.
39. R.G. Pertwee, Pharmacological actions of cannabinoids, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **168**, 1-51 (2005).
40. G. Griffin, E.J. Wray, Q. Tao, S.D. McAllister, W.K. Rorrer, M. Aung, *et al.*, Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: Further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system, *Eur. J. Pharmacol.*, **377**(1), 117-125 (1999).
41. M.W. Elmes, M. Kaczocha, W.T. Berger, K.N. Leung, B.P. Ralph, L. Wang, *et al.*, Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), *J. Biol. Chem.*, **290**(14), 8711-8721 (2015).
42. G. Bénard, F. Massa, N. Puente, J. Lourenço, L. Bellocchio, E. Soria-Gómez, *et al.*, Mitochondrial CB 1 receptors regulate neuronal energy metabolism, *Nat. Neurosci.*, **15**(4), 558-564 (2012).
43. T.H. Smith, L.C. Blume, A. Straiker, J.O. Cox, B.G. David, J.R. Secor-McVoy, *et al.*, Cannabinoid receptor-interacting protein 1a modulates CB1 receptor signaling and regulation, *Mol. Pharmacol.*, **87**(4), 747-765 (2015).
44. M. Salazar, A. Carracedo, Í.J. Salanueva, S. Hernández-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, *et al.*, Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *J. Clin. Invest.*, **119**(5), 1359-1372 (2009).

45. R.A. Ross, Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **140**(5), 790-801 (2003).
46. S.P. Alexander, H.E. Benson, E. Faccenda, A.J. Pawson, J.L. Sharman, M. Spedding, *et al.*, The concise guide to pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **170**(8), 1459-1581 (2013).
47. M. Zubrzycki, A. Liebold, A. Janecka, M. Zubrzycka, A new face of endocannabinoids in pharmacotherapy. Part I: Protective role of endocannabinoids in hypertension and myocardial infarction, *J. Physiol. Pharmacol.*, **65**(2), 171-181 (2014).
48. L.R. Bartner, S. McGrath, S. Rao, L.K. Hyatt, L.A. Wittenburg, Pharmacokinetics of cannabidiol administered by 3 delivery methods at 2 different dosages to healthy dogs, *Can. J. Vet. Res.*, **82**(3), 178-183 (2018).
49. C.S. Repetti, R.J. Girio, M. Friolani, S.M. Barbalho, Perspectives in veterinary medicine on the use of cannabinoids as complementary palliative therapy for pain in cancer patients, *Cienc. Rural (Santa Maria)*, **49**(2), e20180595 (2019).
50. S.L. Casey, N. Atwal, C.W. Vaughan, Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model, *Pain*, **158**(12), 2452-2460 (2017).
51. B. Costa, A.E. Trovato, F. Comelli, G. Giagnoni, M. Colleoni, The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.*, **556**(1-3), 75-83 (2007).
52. M.B. Escobar, *O potencial do canabidiol na terapêutica veterinária: revisão de literatura*, tesis de grado, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Brasil, 2018, 57 p.
53. M.I. Antunes, K. Moreno, C.E. Grumadas, Avaliação e manejo da dor em cães e gatos com câncer - Revisão, *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, **11**(2), 113-119 (2008).
54. M. Guevara, A. Gargiulo, P. Gargiulo, C. Calderón, Cannabis medicinal en mascotas ¿Abriendo la caja de Pandora? *Rev. Vet. Argent.*, **35**(363), 1-5 (2018).
55. E. Russo, G.W. Guy, A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol, *Med. Hypotheses*, **66**(2), 234-246 (2006).
56. M.A. Lessa, I.L. Cavalcanti, N.V. Figueiredo, Cannabinoid derivatives and the pharmacological management of pain, *Rev. Dor. (São Paulo)*, **17**(1), 47-51 (2016).

57. K.M. Honório, A. Arroio, A.B. Da Silva, Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*, *Quim Nova*, **29**(2), 318-325 (2006).
58. E.B. Russo, Cannabinoids in the management of difficult to treat pain, *Ther. Clin. Risk Manag.*, **4**(1), 245-259 (2008).
59. B.T. Simon, P.V. Steagall, The present and future of opioid analgesics in small animal practice, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **40**(4), 315-326 (2017).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.C. García-Cabrera, O.T. Guerron-Morales, J.M. Astaiza-Martínez, C.J. Benavides-Melo, Sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros: revisión narrativa, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 791-811 (2021).

Extended Hildebrand solubility approach and Yalkowsky-Roseman model for estimating the solubility of sulfadiazine and sulfamethazine in some {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures

Martha Sofía Vargas-Santana^{1,2}, Ana María Cruz-González^{1,2}, Nestor Enrique Cerquera³, Alana Sofía Escobar Rodríguez², Rossember E. Cardenas⁴, Omar Calderón-Losada⁴, Claudia Patricia Ortiz⁵, Daniel Ricardo Delgado^{6*}

¹ Environmental Management and Engineering, Universidad Surcolombiana, Colombia.

² Sifati Group Ingeniería S.A.S., Grupo de Investigaciones Ciencia, Ingeniería e Innovación, Palermo, Huila, Colombia.

³ Universidad Surcolombiana, Faculty of Engineering, Agricultural Engineering Program, Hydro Engineering and Agricultural Development Research Group (GHIDA), Avenida Pastrana Borrero-Carrera 1, Neiva, Huila, Colombia.

⁴ Grupo de Físicoquímica y Análisis Matemático, Facultad de Ciencias y Humanidades, Fundación Universidad de América, Avenida Circunvalar N.º 20-53, Bogotá D.C., Colombia.

⁵ Corporación Universitaria Minuto de Dios-UNIMINUTO, Programa de Administración en Salud Ocupacional, Grupo de Investigación en Seguridad y Salud en el Trabajo, Neiva, Huila, Colombia.

⁶ Universidad Cooperativa de Colombia, Department of Engineering, Grupo de Investigación de Ingenierías UCC-Neiva, Calle 11 N.º 1-51, Neiva, Huila, Colombia.

*Address for correspondence: danielr.delgado@campusucc.edu.co

Received: March 22, 2021

Corrected: April 27, 2021

Accepted: May 4, 2021

SUMMARY

Aim: extended Hildebrand Solubility Approach (EHSA) and Yalkowsky Roseman (YR) were applied to evaluate the solubility of sulfadiazine, and sulfamethazine in ethylene glycol + water mixtures. **Methodology:** reported experimental equilibrium solubilities and some fusion properties of these drugs were used for the calculations.

Results: a good predictive character of EHSA (with mean deviations lower than 3.0%) were found by using regular polynomials in order two correlating the interaction parameter W with the Hildebrand solubility parameter of solvent mixtures without drug; however, the results obtained from YR model show relatively high deviations greater than 50%.

Key-words: Sulfadiazine, sulfamethazine, extended Hildebrand model, Yalkowsky-Roseman, solubility, cosolvent mixtures.

RESUMEN

Método extendido de Hildebrand y modelo de Yalkowsky-Roseman en la estimación de la solubilidad de sulfadiazina y sulfametazina en algunas mezclas {etilenglicol (1) + agua (2)} a varias temperaturas

Objetivo: aplicar los enfoques de los modelos de Solubilidad Extendido de Hildebrand (EHSA) y Yalkowsky Roseman (YR) para evaluar la solubilidad de sulfadiazina y sulfametazina en mezclas de etilenglicol + agua. **Metodología:** para los cálculos se utilizaron las solubilidades experimentales en equilibrio reportadas y algunas propiedades de fusión de estos fármacos. **Resultados:** en particular, se encontró un buen carácter predictivo de EHSA (con desviaciones medias inferiores al 3,0%) utilizando polinomios regulares en orden dos correlacionando el parámetro de interacción W con el parámetro de solubilidad de Hildebrand de mezclas de disolventes sin fármaco; sin embargo, los resultados obtenidos del modelo YR muestran desviaciones relativamente altas superiores al 50%.

Palabras clave: Sulfadiazina, sulfametazina, método extendido de Hildebrand, Yalkowsky-Roseman, solubilidad, mezclas cosolventes.

RESUMO

Método de Hildebrand estendido e modelo de Yalkowsky-Roseman na estimativa da solubilidade de sulfadiazina e sulfametazina em algumas misturas {etileno glicol (1) + água (2)} em várias temperaturas

Objetivo: aplicar as abordagens dos modelos de Solubilidade Estendida de Hildebrand (EHSA) e Yalkowsky Roseman (YR) para avaliar a solubilidade de sulfadiazina e sulfametazina em misturas de etilenoglicol + água. **Metodologia:** as solubilidades de equilíbrio experimental relacionadas e algumas propriedades de fusão dessas drogas foram usadas para os cálculos. **Resultados:** em particular, foi encontrado um bom caráter preditivo de EHSA (com desvios médios menores que 3,0%) usando polinômios regulares na ordem dois, correlacionando o parâmetro de interação W com o parâmetro de solubilidade de Hildebrand de misturas de solventes sem fármaco; no entanto, os resultados obtidos com o modelo YR mostram desvios relativamente altos superiores a 50%.

Palavras-chave: Sulfadiazina, sulfametazina, método estendido de Hildebrand, Yalkowsky-Roseman, solubilidade, misturas de cosolventes.

INTRODUCTION

Sulfonamides are a group of synthetic organic compounds that have played an important role as effective chemotherapeutics in bacterial and protozoal infections in veterinary medicine. Indications for sulfonamides are wide against both Gram negative and Gram-positive bacteria, owing to their wide spectrum of activity. Sulfonamides are used to treat infectious diseases of the digestive and respiratory tracts, secondary infections, mastitis, metritis, and foot rot [1-3]. All drugs of the sulfonamide group are currently included in Council Regulation (EEC) N.º2377/90 of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [4]. So, the existing EU Maximum Residue Levels (MRLs) for all drugs of the sulfonamide group is 100 µg/kg in all food-producing species [5].

Sulfadiazine (SD, 4-amino-N-2-pyrimidinylbenzenesulphonamide, molar mass 250.28 g.mol⁻¹, CAS number 68-35-9, molecular structure shown in figure 1) is a sulfonamide drug employed sometimes in human and veterinarian therapeutics because it exhibits a wide spectrum against most gram-positive and gram-negative organisms [6-9]. It inhibits the multiplication of bacteria by acting as a competitive inhibitor of p-aminobenzoic acid in the folic acid metabolism cycle [1, 10-12]. In spite of its continuous therapeutical use its equilibrium solubility data in aqueous-cosolvent mixtures is not yet complete [13].

Sulfamethazine, (SMT, *N*1-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl) sulfanilamide, figure 1), is broadly used in veterinary medicine to treat infectious diseases. SMT abuse in veterinary practice may lead to the presence of SMT residues in food; these residues are harmful to consumers because of their carcinogenic potential and risk of developing antibiotic resistance [14-16].

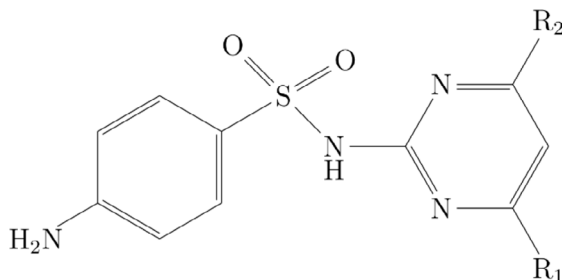


Figure 1. Molecular structure of the sulfonamides considered. Sulfadiazine: R_1 and $R_2 = H$.

Sulfamethazine: R_1 and $R_2 = CH_3$.

SMT has a low aqueous solubility, so solubility studies of this therapeutic agent are important. And within research related to solubility, co-solvency is perhaps the most relevant strategy to increase the solubility of a drug.

The other hand, that predictive methods of physicochemical properties of drugs, in particular those intended for estimating their solubilities in neat solvents and in solvent mixtures, are very important for pharmaceutical and chemical industries [17]. This is because these calculating methods could allow the optimization of several design and development processes. Thus, two of the most widely used methods for predicting solubility in co-solvent mixtures are the Yalkowsky-Roseman (YR) [18, 19] model and extended Hildebrand solubility approach (EHSA) [20-23].

This work presents a physicochemical study about the solubility prediction of SD and SMT in binary mixtures conformed by ethylene glycol + water. The study was done based on the Yalkowsky-Roseman (YR) model and extended Hildebrand solubility approach (EHSA) by using experimental solubility values and some properties relative to the fusion of this drug [24], evaluating the relevance of these models, in predicting the solubility of SD and SMR in the ethylene glycol + water cosolvent system, at different temperatures, to strengthen the data bases, related to the solubility of these drugs, providing a tool that offers reliable information, for the development of processes that involve these drugs and the solvents used.

THEORETICAL

Yalkowsky-Roseman model

The logarithmic solubilities of Yalkowsky-Roseman (YR) model for a solute in the different solvent mixtures including neat solvents were determined with the help of equation [18, 25, 26].

$$\ln x_{3,1+2} = f_1 \ln x_{3,1} + f_2 \ln x_{3,2} \quad (1)$$

where $x_{3,1+2}$ is the drug solubility calculated in the cosolvent mixture considered, $x_{3,1}$ is the drug solubility in the neat cosolvent, $x_{3,2}$ is the drug solubility in neat water, and f is the volume fraction of cosolvent in the mixed solvent. This last term is calculated assuming

$$f_1 = V_1(V_1 + V_2)^{-1} \quad (2)$$

where, V_1 and V_2 are the respective volumes of cosolvent and water.

The equation 1 can be written as [27]:

$$\ln x_{3,1+2} = \ln x_{3,2} + f_1 (\ln x_{3,1} - \ln x_{3,2}) \quad (3)$$

which suggests a linear relationship between $\ln x_{3,1+2}$ and solvent composition [27]. This exponential increase in solubility with cosolvent composition has been repeatedly observed in the literature [27].

Extended Hildebrand Solubility Approach

The extended Hildebrand solubility approach (EHSA), a modification of the Hildebrand-Scatchard equation, permits calculation of the solubility of polar and non-polar solutes in solvents ranging from non-polar hydrocarbons to highly polar solvents such as water, ethanol, and glycols [28]. The solubility parameters of solute and solvent were introduced to explain the behavior of regular and irregular solutions [29, 30]. The extended Hildebrand solubility approach has been developed to reproduce the solubility of drugs and other solids in the binary solvent systems [31-33].

Solubility on the mole fraction scale, x_3 , may be represented by the equation:

$$-\log x_3 = -\log x_3^{\text{id}} + \log \gamma_3 \quad (4)$$

where x_3^{id} is the ideal solubility of the crystalline solid, and γ_3 is the solute activity coefficient in mole fraction terms. Scatchard [34] and Hildebrand and Scott [35] formulated the solubility equation for regular solutions:

$$\log \frac{a_3}{x_3} = \log \gamma_3 = \frac{V_3 \phi_1^2}{2.30RT} (e_{11} + e_{33} - 2e_{13}) \quad (5)$$

where

$$\phi_1 = \frac{V_1(1-x_3)}{V_1(1-x_3)+V_3x_3} \quad (6)$$

V_3 is the molar volume of the hypothetical supercooled liquid solute (subscript 3), ϕ_1 is the volume fraction of the solvent (subscript 1), R is the molar gas constant, and T is the absolute temperature of the experiment.

The terms e_{11} and e_{22} are the cohesive energy densities of solvent and solute, and e_{12} is expressed in regular solution theory as a geometric mean of the solvent and solute cohesive energy densities and is expressed as W in this work [30, 36, 37]:

$$e_{13} = W = \sqrt{e_{11}e_{33}} \quad (7)$$

The square roots of the cohesive energy densities of solute and solvent, called solubility parameters and given the symbol δ , are obtained from the energy or heat of vaporization per volume:

$$\delta_i = \sqrt{e_{ii}} = \sqrt{\frac{\Delta E^v}{V_i}} \cong \left(\frac{\Delta H^v - RT}{V_i} \right)^{1/2} \quad (8)$$

Replacing e_{ii} with δ_i^2 , in equation 5, the expression becomes:

$$\log \gamma_3 = \frac{V_3 \phi_1^2}{2.30RT} (\delta_1^2 + \delta_3^2 - 2\delta_1\delta_3) \quad (9)$$

replacing the first term by δ_1^2 , and factoring the second one:

$$\log \gamma_3 = A(\delta_1 - \delta_3)^2 \quad (10)$$

Substituting equation 10 into equation 4, one obtains the Hildebrand-Scatchard solubility equation [38]:

$$-\log x_3 = -\log x_3^{\text{id}} + A(\delta_1 - \delta_3)^2 \quad (11)$$

where

$$-\log x_3^{\text{id}} = -\frac{\Delta H_{fus}(T_{fus}-T)}{2.303T_{fus}} + \frac{\Delta C_p}{2.303R} \left(\frac{T_{fus}-T}{T} + \ln \frac{T}{T_{fus}} \right) \quad (12)$$

Where ΔH_{fus} is the molar enthalpy of fusion of the pure solute (at the melting point), T_{fus} is the absolute melting point, T is the absolute solution temperature, R is the constant gas ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) and ΔC_p is the difference between the molar heat capacity of the crystalline form and the molar heat capacity of the hypothetical supercooled liquid form, both at the solution temperature. Since ΔC_p values are not commonly reported, they may be approximated to the entropy of fusion, ΔS_{fus} calculated as follows:

$$\Delta C_p = \Delta S_{fus} = \Delta H_{fus} T_{fus}^{-1} \quad (13)$$

replacing δ_1, δ_3 by W , equation 9 becomes

$$\log \gamma_3 = A(\delta_1^2 + \delta_3^2 - 2W) \quad (14)$$

So, equation 4 is rewritten as [39, 40]

$$-\log x_3 = -\log x_3^{\text{id}} + A(\delta_1^2 + \delta_3^2 - 2W) \quad (15)$$

Here, the term is equal to (where, is the Walker parameter). The factor can be calculated from experimental data by means of [41, 42]:

$$W = \frac{\delta_1^2 + \delta_3^2 - \frac{\log \gamma_3}{A}}{2} \quad (16)$$

The experimental values of the W parameter can be correlated by means of regression analysis by using regular polynomials as a function of δ_1 as follows [36, 43]:

$$W = C_0 + C_1 \delta_1 + C_2 \delta_1^2 + C_3 \delta_1^3 \dots C_n \delta_1^n \quad (17)$$

These empiric models can be used to estimate the drug solubility by means of back-calculation, resolving this property from the specific value obtained in the respective polynomial regression [38, 44].

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental solubility data of SD and SMT in (EG + W) cosolvent mixtures were taken from Cruz *et al.* [6] and Adi *et al.* [24]. Table 1 presents basic information for the development of the YR and EHSA models.

Table 1. Some properties of the sulfadiazine and sulfamethazine.

Sulfonamide	Molar mass (g·mol ⁻¹) [45]	x_3^{id} (298.15 K) [46]	V_3 (cm ³ ·mol ⁻¹) [47]	δ_3 (MPa ^{1/2}) [46]	T_{fus} (K) [45]	ΔH_{fus} (kJ·mol ⁻¹) [45]
Sulfadiazine	250.277	30.14±0.12	150.0	28.9	532.6	44.25±0.38
Sulfamethazine	278.33	6.48±0.22	179.0	27.4	468.95	39.22±0.71

The volumetric behavior and polarity of (EG+ W) mixtures, as a function of the composition, are shown in table 2. Volume fractions and Hildebrand solubility parameters were calculated assuming additive behavior.

Table 2. Some physicochemical properties of pure solvents and (EG + W) cosolvent mixtures (298.15 K).

w_1	x_1	ρ (g/cm ³) ^a	f_1	δ_{mix} (MPa ^{1/2})	V_{mix} (cm ³ ·mol ⁻¹)
0.00	0.000	0.9971	0.000	47.9	18.07
0.05	0.015	1.0033	0.045	47.3	18.62
0.10	0.031	1.0096	0.091	46.7	19.21
0.15	0.049	1.0160	0.137	46.1	19.84
0.20	0.068	1.0226	0.183	45.5	20.53
0.25	0.088	1.0292	0.230	44.9	21.28
0.30	0.111	1.0358	0.278	44.3	22.10
0.35	0.135	1.0425	0.326	43.6	22.99
0.40	0.162	1.0491	0.375	43.0	23.98
0.45	0.192	1.0556	0.424	42.4	25.07
0.50	0.225	1.0621	0.473	41.7	26.29

(Continued)

w_1	x_1	ρ (g/cm ³) ^a	f_1	δ_{mix} (MPa ^{1/2})	V_{mix} (cm ³ ·mol ⁻¹)
0.55	0.262	1.0683	0.523	41.1	27.66
0.60	0.303	1.0743	0.574	40.4	29.21
0.65	0.350	1.0799	0.625	39.8	30.97
0.70	0.404	1.0852	0.677	39.1	32.99
0.75	0.465	1.0900	0.729	38.4	35.34
0.80	0.537	1.0944	0.782	37.7	38.09
0.85	0.622	1.0986	0.836	37.0	41.34
0.90	0.723	1.1026	0.890	36.3	45.23
0.95	0.847	1.1067	0.945	35.6	49.97
1.00	1.000	1.1099	1.000	34.9	55.92

^a The density was calculated by regression, from the density data published by Egorov *et al.* [48].

Tables 3 and 4 presents the solubility data of the SD and SMT calculated using the YR model, and standard deviations (SD) with respect to the experimental values.

Table 3. Calculated solubility of SD in {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures by using the equations 3, and standard deviations with respect to the experimental values.

f_1	$10^5 x_3$ (calculated)								
	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
0.00	0.161	0.201	0.286	0.380	0.481	0.649	0.869	1.140	1.220
0.05	0.185	0.224	0.333	0.395	0.591	0.672	0.943	1.398	1.850
0.09	0.225	0.300	0.415	0.564	0.687	0.913	1.238	1.833	2.239
0.14	0.280	0.351	0.514	0.626	0.769	1.056	1.241	1.750	2.588
0.18	0.318	0.412	0.540	0.748	0.828	1.214	1.336	1.910	2.832
0.23	0.413	0.498	0.630	0.837	0.973	1.358	1.547	2.138	3.043
0.28	0.486	0.589	0.723	0.976	1.140	1.566	1.856	2.437	3.316
0.33	0.631	0.759	0.918	1.228	1.478	1.925	2.293	2.931	4.412
0.37	0.781	0.984	1.222	1.573	1.808	2.437	2.854	4.013	5.653
0.42	1.029	1.188	1.396	1.956	2.248	3.115	3.770	4.816	6.559
0.47	1.212	1.410	1.694	2.333	2.695	3.735	4.331	5.803	7.546
0.52	1.560	1.677	2.139	2.860	3.493	4.707	5.941	7.506	8.813
0.57	1.897	2.090	2.964	3.561	4.514	5.858	6.893	8.648	10.431
0.63	2.587	3.085	3.703	4.904	5.732	7.561	9.287	11.340	14.447

(Continued)

f_1	$10^5 x_3$ (calculated)								
	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
0.68	3.575	4.173	5.029	6.568	7.496	10.035	11.458	14.922	17.725
0.73	4.978	5.894	6.984	8.774	10.224	12.722	15.177	18.014	21.874
0.78	7.839	9.158	9.996	12.396	13.840	16.769	19.306	22.253	26.691
0.84	10.447	12.161	14.092	16.693	19.235	22.440	25.720	29.602	34.180
0.89	14.251	16.997	20.412	22.733	26.761	29.829	32.805	38.468	43.901
0.94	22.764	25.775	28.873	32.962	37.403	41.475	46.010	51.426	57.120
1.00	33.985	37.884	41.290	47.027	53.221	57.493	63.673	69.392	75.162
Percentage dev. ^a									
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.05	11.01	13.67	7.27	19.55	0.65	18.27	11.91	-1.82	-20.56
0.09	16.10	7.75	8.13	4.34	7.28	6.79	3.68	-9.71	-20.78
0.14	19.42	17.13	9.73	17.39	19.04	13.49	26.04	14.30	-17.11
0.18	35.18	27.36	31.61	22.95	37.70	21.70	42.92	26.79	-8.25
0.23	33.58	34.87	42.56	37.86	46.30	34.27	51.10	37.43	3.65
0.28	46.48	46.38	57.37	48.57	56.13	44.15	54.45	46.57	15.73
0.33	45.98	45.97	57.49	48.85	50.97	45.47	53.67	48.49	6.01
0.37	52.98	45.25	50.66	46.88	55.11	42.84	52.10	32.38	1.06
0.42	50.93	55.56	68.26	49.61	57.15	39.24	42.14	34.95	6.60
0.47	67.14	70.01	77.52	59.24	65.51	45.03	53.11	37.31	13.68
0.52	69.88	85.84	80.37	65.43	61.69	44.10	38.41	30.44	19.66
0.57	83.20	94.46	67.43	69.58	58.79	45.33	48.30	39.42	24.56
0.63	76.69	72.32	72.91	57.61	59.13	41.66	37.15	31.23	11.07
0.68	68.71	67.11	64.73	51.02	55.27	34.63	38.84	23.36	12.06
0.73	60.36	55.64	53.89	45.49	45.65	34.29	31.24	26.71	12.67
0.78	35.19	32.19	39.89	32.90	38.03	29.17	29.50	27.49	14.83
0.84	35.08	31.78	29.49	27.71	27.76	22.70	22.32	19.41	11.80
0.89	32.30	25.20	17.01	21.72	18.47	17.66	20.99	14.77	8.78
0.94	11.01	9.98	8.60	9.27	9.66	8.16	9.12	7.49	4.76
1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^a Calculated as $100|x_{3cal} - x_{3exp}|/|x_{3exp}|$

Table 4. Calculated solubility of SMT in {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures by using the equations 3, and standard deviations with respect to the experimental values.

f_1	$10^4 x_3$ (calculated)								
	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
0.00	0.114	0.132	0.174	0.222	0.281	0.367	0.433	0.555	0.661
0.05	0.143	0.165	0.217	0.274	0.346	0.449	0.528	0.673	0.796
0.09	0.181	0.208	0.271	0.340	0.426	0.550	0.646	0.817	0.961
0.14	0.228	0.263	0.338	0.422	0.527	0.675	0.791	0.994	1.161
0.18	0.290	0.333	0.424	0.525	0.653	0.831	0.972	1.211	1.407
0.23	0.368	0.422	0.532	0.655	0.810	1.025	1.195	1.480	1.707
0.28	0.469	0.536	0.670	0.819	1.008	1.267	1.474	1.812	2.076
0.33	0.599	0.683	0.845	1.026	1.256	1.569	1.822	2.223	2.530
0.37	0.766	0.873	1.069	1.288	1.570	1.948	2.256	2.733	3.089
0.42	0.984	1.119	1.356	1.622	1.967	2.424	2.801	3.368	3.781
0.47	1.266	1.438	1.724	2.047	2.470	3.024	3.485	4.159	4.637
0.52	1.635	1.852	2.197	2.590	3.110	3.781	4.346	5.148	5.699
0.57	2.116	2.392	2.808	3.286	3.925	4.739	5.434	6.387	7.021
0.63	2.746	3.098	3.598	4.179	4.966	5.954	6.809	7.943	8.669
0.68	3.574	4.024	4.623	5.329	6.300	7.499	8.555	9.902	10.728
0.73	4.666	5.242	5.957	6.814	8.012	9.470	10.774	12.373	13.307
0.78	6.109	6.848	7.696	8.736	10.218	11.989	13.605	15.499	16.546
0.84	8.022	8.974	9.972	11.231	13.065	15.218	17.223	19.463	20.622
0.89	10.566	11.794	12.959	14.479	16.752	19.368	21.862	24.504	25.767
0.94	13.961	15.549	16.889	18.720	21.540	24.718	27.824	30.931	32.277
1.00	18.504	20.564	22.078	24.274	27.774	31.631	35.508	39.146	40.533
Porcentaje dev. ^a									
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.05	12.36	11.66	22.91	13.20	12.74	18.98	14.77	19.69	17.95
0.09	17.40	4.69	8.84	8.02	11.34	24.60	19.93	29.78	28.38
0.14	12.18	1.24	5.43	8.44	27.43	23.91	25.50	32.54	19.42
0.18	18.85	13.27	18.63	21.02	35.84	32.34	29.95	36.11	40.04
0.23	29.61	18.65	27.84	26.30	39.95	40.58	37.84	52.32	38.36
0.28	29.34	26.75	34.39	28.53	46.60	43.43	39.64	44.67	45.00
0.33	37.43	27.11	35.09	30.01	44.19	42.17	36.29	48.33	55.66

(Continued)

f_1	$10^4 x_3$ (calculated)								
	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
0.37	37.27	39.30	44.95	39.84	39.63	44.81	50.09	49.10	54.52
0.42	46.86	28.13	31.12	29.70	53.71	41.57	43.03	46.15	47.57
0.47	48.82	40.15	42.25	40.14	52.88	45.01	51.88	46.66	52.15
0.52	51.25	44.57	38.75	40.66	58.41	45.39	54.68	48.69	40.82
0.57	64.73	47.66	50.01	57.02	70.25	57.51	56.57	54.80	46.89
0.63	62.07	57.77	37.33	52.50	64.72	48.24	47.30	44.97	46.17
0.68	59.80	58.85	52.27	59.96	63.26	53.24	53.26	49.75	43.74
0.73	44.53	54.75	57.65	51.89	44.45	51.24	47.68	42.26	42.17
0.78	48.37	34.04	39.23	34.39	38.04	42.25	46.32	52.83	45.54
0.84	52.71	47.51	40.83	46.51	44.27	52.47	52.92	54.94	52.28
0.89	54.28	45.75	39.26	44.00	50.37	51.64	58.98	57.35	52.41
0.94	6.69	8.78	8.08	7.83	7.92	12.85	13.00	12.92	7.93
1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^aCalculated as $100|x_3^{\text{cal}} - x_3^{\text{exp}}|/x_3^{\text{exp}}$

When evaluating the individual deviations of the calculated data with respect to the experimental data, relatively large deviations are observed, with a maximum of 94.46% for the SD and 57.51% for the SMT. As a general measure of the validity of the two models, the mean percentage deviation values were calculated according to equation 18, where n is the number of points of the resulting cosolvent composition.

$$MPD = \frac{100}{n} \sum_{t=1}^n \frac{x_3^{\text{cal}} - x_3^{\text{Exp}}}{x_3^{\text{Exp}}} \quad (18)$$

Thus, in general, the YR model presents an MPD of 31.1% for SD and 34.8% for SMT, an acceptable percentage for the pharmaceutical industry. Figure 2 shows that, in general, the deviations were greater in intermediate mixtures and are reduced in mixtures rich in either of the two solvents.

On the other hand, when plotting the calculated solubility vs. the experimental solubility (figure 3), pooled data is obtained, indicating a good predictability of the model.

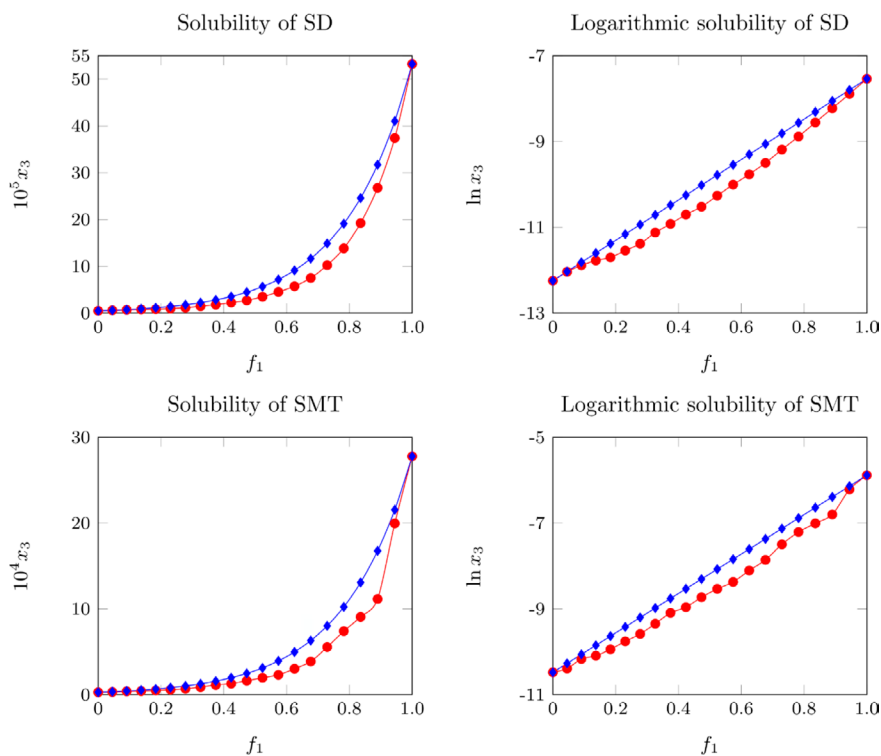


Figure 2. Experimental and calculated solubility of SD and SMT in (EG + W) mixtures at 298.15 K.

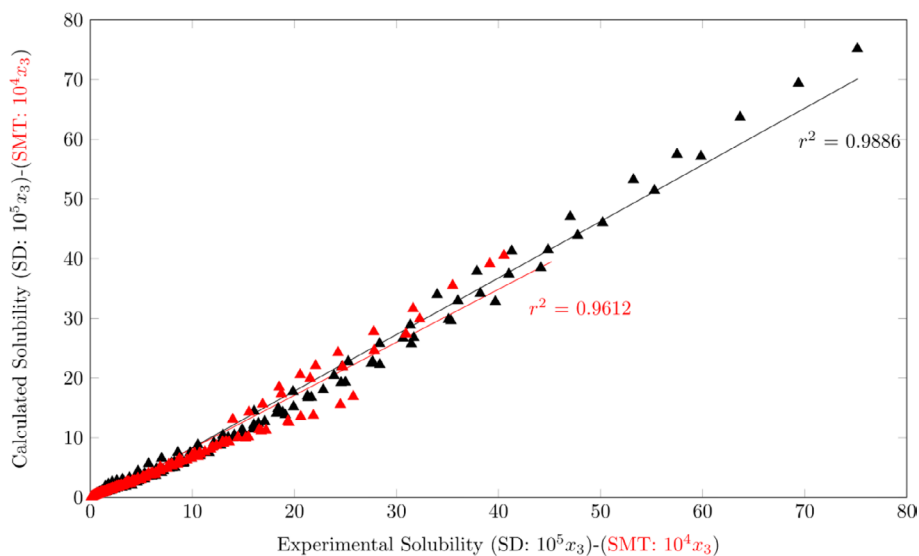


Figure 3. Calculated solubility vs. experimental solubility by YR model of SD and SMT in (EG + W) mixtures.

Figure 4 shows the experimental solubility of SD and SMT in (EG + W) mixtures, the solubility calculated using the equation for regular solutions, and the solubility calculated using the MESH as a function of the solubility parameter of solvent mixtures; the logarithm of experimental solubility and calculated solubility by EHSA are also presented. The experimental solubility is greater than the calculated solubility by using the regular solution model in every one of the mixtures evaluated. This result could be attributed to the fact that this semiempirical model does not consider specific interactions between solvent and solute, and all the involved compounds present polar groups that could interact by hydrogen bonding. In principle, SD and SMT would behave like a Lewis base in mixtures rich in water due to the pair of free electrons of its groups $-\text{SO}_2-$, $-\text{NH}_2-$ and $=\text{N}-$ in addition to the fact that water is more acidic than EG according to the acid and basicity parameters of Kamlet-Taft ($\alpha_2=1.017\pm 0.0236$, $\alpha_1=0.792\pm 0.004$ [49], and $\beta_2=0.14$ $\beta_1=0.51$ [50]), and as a Lewis acid in intermediate and rich mixtures in EG due to the hydrogen of its groups $-\text{NH}_2-$ and $-\text{NH}-$. Although, it is evident that the Hildebrand model of regular solutions does not allow obtaining data consistent with the experimental ones, the results obtained with the EHSA model, using the W calculated with the second order polynomial, overlap with the experimental data.

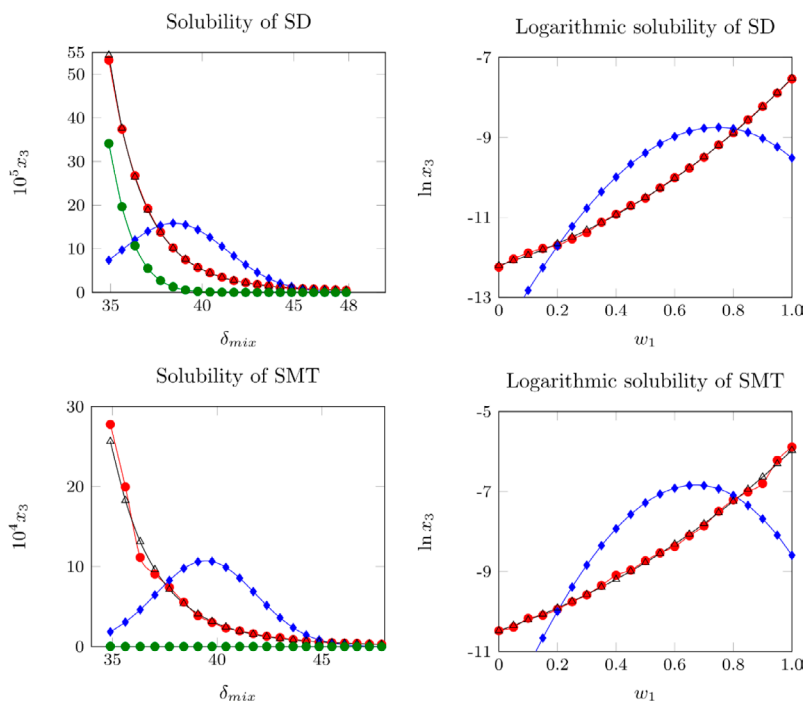


Figure 4. Experimental and calculated solubility of SD and SMT at 298.15 K (Δ : Calculated solubility by EHSA model (Polynomial 2); \bullet : experimental solubility; \bullet : Calculated solubility by EHSA model (Polynomial 1) and \bullet : Calculated solubility by regular solution model).

Regarding the solubility calculated using the EHSA model, to calculate the parameter (table 5), the calculated δ_{mix} value was used (table 2). On the other hand, the parameter A , is presented in table 5 too. Figure 5 shows that the variation of the parameter with respect to the solubility parameter of solvent mixtures, presents deviation from linear behavior.

Table 5. A and W experimental parameters for SD and SMT in (EG + W) mixtures at 298.15 K.

δ_{mix} (MPa ^{1/2})	SD		SMT	
	100 A (cm ³ ·J ⁻¹)	W (J·cm ⁻³)	100 A (cm ³ ·J ⁻¹)	W (J·cm ⁻³)
47.86	2.63	1509.4	3.80	1421.6
47.27	2.63	1483.3	3.80	1394.3
46.68	2.63	1456.7	3.80	1367.8
46.09	2.63	1430.0	3.80	1340.5
45.48	2.63	1402.9	3.80	1313.7
44.87	2.63	1376.7	3.80	1287.2
44.26	2.63	1350.6	3.80	1260.8
43.63	2.63	1325.4	3.79	1234.7
43.01	2.63	1299.8	3.79	1208.9
42.37	2.63	1274.4	3.79	1182.5
41.73	2.63	1248.9	3.79	1156.8
41.08	2.63	1224.1	3.79	1131.0
40.42	2.63	1199.5	3.79	1105.2
39.76	2.63	1174.9	3.78	1080.1
39.09	2.63	1150.6	3.78	1055.0
38.41	2.63	1126.9	3.78	1030.8
37.72	2.62	1103.3	3.77	1006.3
37.03	2.62	1080.1	3.77	981.6
36.33	2.62	1057.1	3.76	957.0
35.62	2.62	1034.3	3.74	934.8
34.90	2.62	1012.0	3.72	911.4

W values were adjusted to regular polynomials in orders from 2 to 5 (equation 17). Nevertheless, linear model was also evaluated with comparative purposes. Table 6 and table 7, summarizes the coefficients obtained in all the regular polynomials from degrees one to five for SD an SMT.

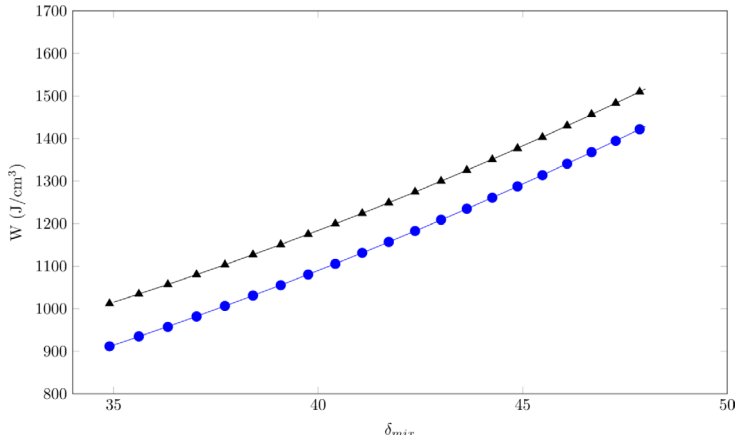


Figure 5. W parameter as a function of the solubility parameter of the solvent mixtures in (EG + W) mixtures (SD: ●; SMT: ▲).

Table 6. Coefficients and statistical parameters of regular polynomials in several orders of W as a function of solubility δ_{mix} free of SD (equation 17) in (EG + water) mixtures.

Coefficient	Polynomial order				
	1	2	3	4	5
C_0	-347.25 ± 20.22	678.60 ± 7.40	589.90 ± 88.93	-15.45 ± 1108.24	13471.43 ± 13731.39
C_1	38.48 ± 0.48	-11.47 ± 0.36	-4.97 ± 6.50	54.195 ± 108.16	-1594.46 ± 1676.56
C_2		0.602 ± 0.004	0.44 ± 0.16	-1.72 ± 3.94	78.65 ± 81.65
C_3			0.001 ± 0.001	0.036 ± 0.06	-1.92 ± 1.98
C_4				-0.00025 ± 0.00038	0.02 ± 0.024
C_5					-0.0001 ± 0.0001
Adj. R^2	0.997	1.000	1.000	1.000	1.000
Fit. Err	8.695	0.272	0.272	0.278	0.278

Table 7. Coefficients and statistical parameters of regular polynomials in several orders of W as a function of solubility δ_{mix} free of SMT (equation 17) in (EG + water) mixtures.

Coef.	Polynomial order				
	1	2	3	4	5
C_0	-482.22 ± 18.75	468.61 ± 10.18	665.88 ± 116.33	3007.99 ± 1340.08	3330.59 ± 7132.80
C_1	39.48 ± 0.45	-6.82 ± 0.49	-21.27 ± 8.50	-250.19 ± 130.79	-289.63 ± 2091.84
C_2		0.558 ± 0.006	0.91 ± 0.21	9.27 ± 4.77	11.19 ± 101.88
C_3			-0.003 ± 0.002	-0.14 ± 0.08	-0.18 ± 2.47
C_4				0.0008 ± 0.0004	0.001 ± 0.030
C_5					-0.000003 ± 0.000144
Adj. R^2	0.997	1.000	1.000	1.000	1.000
Fit. Err	8.064	0.374	0.356	0.336	0.347

Tables 8 and 9 report the calculated solubility of SD and SMT and the respective percentages of deviation. When using the values of the factor W calculated with the polynomial of order 1, the deviations of the calculated data with respect to the experimental data is greater than 60%, indicating that the model is not the appropriate one. However, when using the results of W , calculated with a polynomial greater than or equal to 2, the deviations are low, presenting a good correlation between the calculated and experimental data.

Table 8. Calculated solubility of sulfadiazine in (EG + water) mixtures by using the W parameters obtained from regression models in orders 1, 2, 3, 4 and 5, and standard deviations with respect to the experimental values, at 298.15 K.

δ_{mix} (MPa ^{1/2})	x_3 (calculated)					Percentage desv.				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
47.9	0.08	0.50	0.51	0.51	0.50	84.0	4.32	5.78	5.00	3.77
47.3	0.15	0.57	0.57	0.57	0.57	75.2	4.11	3.52	3.57	3.14
46.7	0.27	0.65	0.65	0.65	0.65	60.8	5.99	5.96	5.65	4.72
46.1	0.48	0.74	0.74	0.75	0.75	38.0	3.23	3.62	3.14	2.30
45.5	0.81	0.87	0.86	0.87	0.87	1.8	4.69	3.98	4.49	4.91
44.9	1.33	1.02	1.01	1.02	1.01	37.1	4.90	4.05	4.44	4.29
44.3	2.10	1.21	1.20	1.21	1.20	84.1	6.47	5.58	5.77	5.16
43.6	3.17	1.46	1.45	1.45	1.44	114.4	1.16	1.90	1.93	2.72
43.0	4.58	1.78	1.77	1.77	1.75	153.5	1.54	2.12	2.34	3.12
42.4	6.34	2.19	2.19	2.18	2.17	181.9	2.39	2.75	3.11	3.67
41.7	8.37	2.74	2.74	2.72	2.72	210.4	1.60	1.49	1.03	0.83
41.1	10.53	3.46	3.47	3.45	3.46	201.4	0.92	0.76	1.20	0.96
40.4	12.61	4.43	4.45	4.44	4.47	179.4	1.76	1.35	1.70	1.09
39.8	14.36	5.76	5.80	5.78	5.83	150.5	0.46	1.12	0.92	1.77
39.1	15.51	7.58	7.64	7.65	7.71	106.9	1.15	1.98	1.99	2.82
38.4	15.87	10.13	10.22	10.25	10.30	55.2	0.89	0.02	0.23	0.73
37.7	15.35	13.74	13.86	13.92	13.91	10.9	0.69	0.12	0.57	0.51
37.0	14.00	18.92	19.04	19.14	19.01	27.2	1.61	1.04	0.50	1.18
36.3	12.04	26.47	26.52	26.64	26.35	55.0	1.07	0.92	0.47	1.54
35.6	9.73	37.62	37.43	37.45	37.18	74.0	0.58	0.07	0.14	0.59
34.9	7.38	54.38	53.59	53.19	53.80	86.1	2.17	0.70	0.05	1.09
					Mean value	94.7	2.46	2.32	2.30	2.42
					Standard deviation	62.8	1.87	1.90	1.90	1.55

Table 9. Calculated solubility of sulfamethazine in EG + water mixtures by using the W parameters obtained from regression models in orders 1, 2, 3, 4 and 5, and standard deviations with respect to the experimental values, at 298.15 K.

δ_{mix} (MPa ^{1/2})	x_3 calculated					% Desv.				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
47.9	0.02	0.28	0.27	0.28	0.28	91.9	0.22	4.18	0.12	0.16
47.3	0.05	0.32	0.31	0.31	0.31	82.9	4.42	2.35	2.69	2.70
46.7	0.11	0.37	0.37	0.36	0.36	70.3	4.04	4.13	5.90	5.86
46.1	0.23	0.43	0.43	0.42	0.42	43.4	2.80	4.13	1.29	1.32
45.5	0.46	0.50	0.51	0.49	0.49	5.2	3.30	5.56	2.72	2.74
44.9	0.84	0.58	0.60	0.59	0.59	44.6	1.06	3.73	1.63	1.63
44.3	1.45	0.70	0.71	0.71	0.71	110.7	1.23	3.98	2.95	2.93
43.6	2.36	0.84	0.86	0.86	0.86	170.6	4.03	1.67	1.50	1.53
43.0	3.60	1.02	1.04	1.05	1.05	220.3	9.70	7.96	6.80	6.83
42.4	5.15	1.24	1.26	1.29	1.29	302.1	2.76	1.58	0.48	0.46
41.7	6.88	1.54	1.55	1.59	1.59	325.5	4.50	4.15	1.72	1.73
41.1	8.56	1.93	1.92	1.97	1.97	336.0	1.51	2.02	0.45	0.46
40.4	9.91	2.45	2.42	2.46	2.47	329.8	6.23	4.79	6.92	6.94
39.8	10.65	3.14	3.08	3.11	3.11	253.3	4.22	2.06	3.20	3.23
39.1	10.60	4.08	3.97	3.97	3.97	174.7	5.69	2.97	2.89	2.92
38.4	9.76	5.37	5.22	5.15	5.15	76.0	3.19	5.87	7.15	7.14
37.7	8.28	7.15	6.97	6.80	6.80	11.9	3.40	5.87	8.17	8.18
37.0	6.45	9.62	9.45	9.16	9.16	28.8	6.26	4.30	1.20	1.17
36.3	4.60	13.12	13.05	12.73	12.72	58.7	17.74	17.16	14.25	14.21
35.6	3.06	18.28	18.58	18.52	18.51	84.7	8.39	6.90	7.23	7.26
34.9	1.85	25.64	26.85	27.98	27.99	93.3	7.67	3.33	0.73	0.77
					Mean value	138.8	4.87	4.70	3.81	3.82
					Standard deviation	111.6	3.83	3.32	3.55	3.54

These results can be corroborated in figure 6, where the data calculated with polynomial 1 show a high dispersion, contrary to the data calculated with the polynomial of order 2, which present a correlation coefficient greater than 0.99.

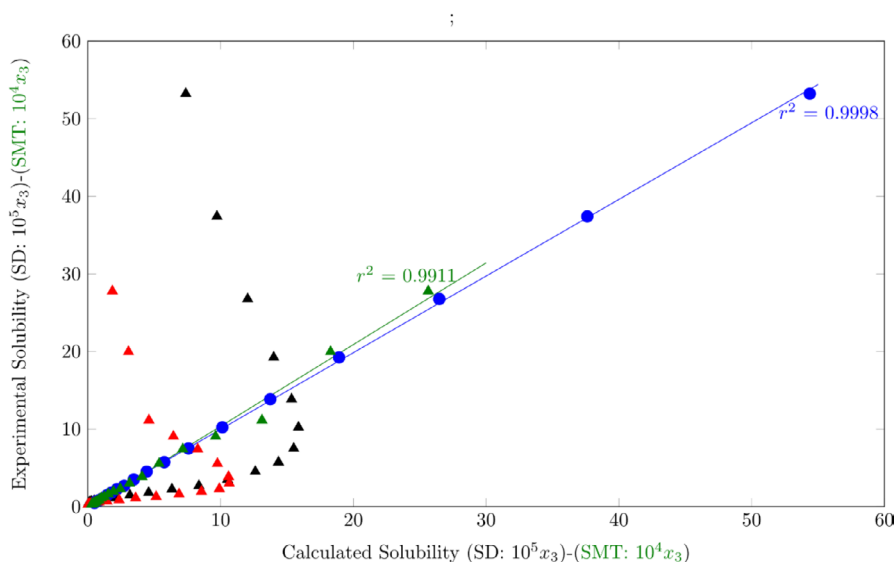


Figure 6. Calculated solubility vs experimental solubility by EHSA model of SD and SMT in (EG + W) mixtures (\blacktriangle : SD polynomial 1; \blacktriangle : SMT polynomial 1; \bullet : SD polynomial 2; \blacktriangle : SMT polynomial 2).

CONCLUSIONS

The results obtained from the Yalkowsky-Roseman linear model do not present a good correlation with the experimental data, possibly due to the simplicity of the model, which does not consider the solute-solvent and solvent-solvent molecular interactions. However, the results of the extended Hildebrand solubility approach (EHSA), calculated with a polynomial greater than or equal to two, present interesting correlations, with deviation percentages less than 3%.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. M.d.M. Muñoz, D.R. Delgado, M.Á. Peña, A. Jouyban, F. Martínez, Solubility and preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in propylene glycol + water mixtures at 298.15 K, *J. Mol. Liq.*, **204**, 132-136 (2015), doi: 10.1016/j.molliq.2015.01.047.

2. B. Aday, P. Sola, F. Çolak, M. Kaya, Synthesis of novel sulfonamide analogs containing sulfamerazine/sulfaguanidine and their biological activities, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **31**, 1005-1010 (2016), doi: 10.3109/14756366.2015.1079183.
3. D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method, *J. Mol. Liq.*, **193**, 152-159 (2014), doi: 10.1016/j.molliq.2013.12.021.
4. Regulation on Maximum Residue Limits, Salud pública, (n.d.), URL: https://ec.europa.eu/health/veterinary-use/maximum-residue-limits/regulations_es, accessed January 29, 2021.
5. European Commission, *EEC Regulation 90/2377/EEC incorporating amending regulation 92/675/EEC*, Brussels, 1997, URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997L0078&from=LV>, accessed January 29, 2021.
6. A.M. Cruz-González, M.S. Vargas-Santana, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, F. Martínez, A. Jouyban, W.E. Acree Jr., Solubility of sulfadiazine in (ethylene glycol + water) mixtures: Measurement, correlation, thermodynamics and preferential solvation, *J. Mol. Liq.*, **323**, 115058 (2021), doi: 10.1016/j.molliq.2020.115058.
7. D.R. Delgado, O. Bahamón-Hernandez, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, F. Martínez, E. Rahimpour, A. Jouyban, W.E. Acree, Solubility of sulfadiazine in (acetonitrile + methanol) mixtures: Determination, correlation, dissolution thermodynamics and preferential solvation, *J. Mol. Liq.*, **322**, 114979 (2021), doi: 10.1016/j.molliq.2020.114979.
8. M.M. Muñoz, F. Martinez, D.R. Delgado, A. Jouyban, W.E. Acree, Equilibrium solubility and apparent specific volume at saturation of sodium sulfadiazine in some aqueous cosolvent mixtures at 298.2 K, *Phys. Chem. Liq.*, **59**, 40-52 (2021), doi: 10.1080/00319104.2019.1675158.
9. D.M. Jiménez, Z.J. Cárdenas, D.R. Delgado, M.T. Peña, F. Martínez, Solubility temperature dependence and preferential solvation of sulfadiazine in 1,4-dioxane+water co-solvent mixtures, *Fluid Phase Equilib.*, **397**, 26-36 (2015), doi: 10.1016/j.fluid.2015.03.046.
10. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol+water mixtures at several temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, **379**, 128-138 (2014), doi: 10.1016/j.fluid.2014.07.013.

11. D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method, *J. Mol. Liq.*, **193**, 152-159 (2014), doi: 10.1016/j.molliq.2013.12.021.
12. D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics of sulfadiazine in some ethanol + water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **187**, 99-105 (2013), doi: 10.1016/j.molliq.2013.06.011.
13. D.R. Delgado, F. Martínez R., Thermodynamic study of the solubility of sodium sulfadiazine in some ethanol + water cosolvent mixtures, *Vitae*, **17**, 191-198 (2010).
14. KJ. Deng, X.H. Lan, G. Sun, L.Y. Ji, X. lian Zheng, Determination of sulfonamide residues in chicken liver using high-performance liquid chromatography, *Food Anal. Methods*, **9**, 3337-3344 (2016), doi: 10.1007/s12161-016-0514-6.
15. R. Galarini, F. Diana, S. Moretti, B. Puppini, G. Saluti, L. Persic, Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed, *Food Control*, **35**, 300-310 (2014), doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.014.
16. A. Barani, A.A. Fallah, Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and florfenicol in farmed rainbow trout in Iran, *Food Agr. Immunol.*, **26**, 420-429 (2015), doi: 10.1080/09540105.2014.950199.
17. R.E. Cárdenas, L.E. Tinoco, D.M. Galindres, A. Beltrán, C.D. Oviedo, J. Osorio, Prediction of sulfadiazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**, 822-842 (2020), doi: 10.15446/rcciquifa.v49n3.91347.
18. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, F. Martínez, Performance of the Jouyban-Acree and Yalkowsky-Roseman models for estimating the solubility of indomethacin in ethanol+ water mixtures, *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat.*, **35**, 329-337 (2011).
19. J.T. Rubino, S.H. Yalkowsky, Cosolvency and deviations from log-linear solubilization, *Pharm. Res.*, **4**, 231-236 (1987), doi: 10.1023/A:1016408211963.
20. J.L. Gómez, G.A. Rodríguez, D.M. Cristancho, D.R. Delgado, A. Yurquina, F. Martínez, Extended Hildebrand Solubility Approach applied to nimodipine in PEG 400 + ethanol mixtures, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **42**, 103-121 (2013).

21. Z.J. Cárdenas, D.M. Jiménez, D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach applied to some sulphonamides in propylene glycol + water mixtures, *Phys. Chem. Liq.*, **53**, 763-775 (2015), doi: 10.1080/00319104.2015.1048247.
22. G.R. Rojas, A.F. Rivera, D.R. Delgado, Application of the Extended Hildebrand solubility approach applied to mitomycin C in ethanol+water mixtures, *Revista Ingeniería y Región*, **13**, 149-157 (2015), doi: 10.25054/22161325.716.
23. D.M. Cristancho, D.R. Delgado, F. Martínez, Meloxicam solubility in ethanol+water mixtures according to the extended Hildebrand solubility approach, *J. Solution Chem.*, **42**, 1706-1716 (2013), doi: 10.1007/s10953-013-0058-y.
24. A. Aydi, C.P. Ortiz, D.I. Caviedes-Rubio, C. Ayadi, S. Hbaieb, D.R. Delgado, Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in ethylene glycol + water mixtures, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **118**, 68-77 (2021), doi: 10.1016/j.jtice.2020.12.031.
25. J.W. Millard, F.A. Alvarez-Núñez, S.H. Yalkowsky, Solubilization by cosolvents: Establishing useful constants for the log-linear model, *Int. J. Pharm.*, **245**, 153-166 (2002), doi: 10.1016/S0378-5173(02)00334-4.
26. M. Gantiva, E.F. Vargas, M.E. Manzur, A. Yurquina, F. Martínez, Modelos de Yalkowsky-Roseman y Jouyban-Acree en la estimación de la solubilidad del keto profeno en algunas mezclas cosolventes propilenoglicol + agua, *Rev. Colomb. Ciencias Quim. Farm.*, **38**, 156-171 (2009).
27. S.H. Yalkowsky, J.T. Rubino, Solubilization by cosolvents I: Organic solutes in propylene glycol-water mixtures, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 416-421 (1985), doi: 10.1002/jps.2600740410.
28. C.V.S. Subrahmanyam, M. Sreenivasa-Reddy, J. Venkata-Rao, P. Gundu-Rao, Irregular solution behaviour of paracetamol in binary solvents, *Int. J. Pharm.*, **78**, 17-24 (1992), doi: 10.1016/0378-5173(92)90350-B.
29. P.R. Sathesh Babu, C.V.S. Subrahmanyam, J. Thimmasetty, R. Manavalan, K. Valliappan, Extended Hansen's solubility approach: meloxicam in individual solvents, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **20**, 311-316 (2007), doi: 10.1016/S0939-6411(98)00079-4.

30. J.H. Hildebrand, J.M. Prausnitz, R.L. Scott, *Regular and Related Solutions*, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1970.
31. A. Martin, J. Carstensen, Extended solubility approach: Solubility parameters for crystalline solid compounds, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 170-172 (1981), doi: 10.1002/jps.2600700214.
32. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach applied to some structurally related sulfonamides in ethanol + water mixtures, *Rev. Colomb. Quim.*, **45**(1), 34-43 (2016), doi: 10.15446/rev.colomb.quim.v45n1.57201.
33. A.R. Holguín, D.R. Delgado, F. Martínez, Indomethacin solubility in propylene glycol + water mixtures according to the Extended Hildebrand Solubility Approach, *Lat. Am. J. Pharm.*, **31**, 720-726 (2012).
34. G. Scatchard, Equilibria in non-electrolyte solutions in relation to the vapor pressures and densities of the components, *Chem. Rev.*, **8**, 321-333 (1931), doi: 10.1021/cr60030a010.
35. J.H. Hildebrand, R.L. Scott, *The Solubility of Nonelectrolytes*, 3rd ed., Dover, New York, 1964.
36. A. Martin, P.L. Wu, A. Adjei, M. Mehdizadeh, K.C. James, C. Metzler, Extended Hildebrand solubility approach: Testosterone and testosterone propionate in binary solvents, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1334-1340 (1982), doi: 10.1002/jps.2600711207.
37. A. Adjei, J. Newburger, A. Martin, Extended Hildebrand approach: Solubility of caffeine in dioxane-water mixtures, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 659-661 (1980), doi: 10.1002/jps.2600690613.
38. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach applied to sulphadiazine, sulphamerazine and sulphamethazine in some {1-propanol (1) + water (2)} mixtures at 298.15 K, *Phys. Chem. Liq.*, **57**, 388-400 (2019), doi: 10.1080/00319104.2018.1476976.
39. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, F. Martínez, Indomethacin solubility estimation in 1,4-dioxane + water mixtures by the extended hildebrand solubility approach, *Quím. Nova*, **34**, 1569-1574 (2011), doi: 10.1590/S0100-40422011000900016.
40. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, C.P. Mora, A. Yurquina, F. Martínez, Estimation of the indomethacin solubility in ethanol + water mixtures by the extended Hildebrand solubility approach, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **39**, 79-95 (2010).

41. E.E. Walker, The solvent action of organic substances on polyacrylonitrile, *J. Appl. Chem.*, **2**, 470-481 (1952), doi: 10.1002/jctb.5010020808.
42. S.J. Rodríguez, D.M. Cristancho, P.C. Neita, E.F. Vargas, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach in the solubility estimation of the sunscreen ethylhexyl triazone in ethyl acetate + ethanol mixtures, *Lat. Am. J. Pharm.*, **29**, 1113-1119 (2010).
43. R.G. Sotomayor, A.R. Holguín, D.M. Cristancho, D.R. Delgado, F. Martínez, Extended Hildebrand Solubility Approach applied to piroxicam in ethanol + water mixtures, *J. Mol. Liq.*, **180**, 34-38 (2013), doi: 10.1016/j.molliq.2012.12.028.
44. D.R. Delgado, M. Peña, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach applied to some sulphapyrimidines in some {methanol (1) + water (2)} mixtures, *Phys. Chem. Liq.*, **56**, 176-188 (2018), doi: 10.1080/00319104.2017.1317779.
45. F. Martínez, A. Gómez, Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in octanol, water, and the mutually saturated solvents, *J. Solution Chem.*, **30**, 909-923 (2001), doi: 10.1023/A:1012723731104.
46. D.R. Delgado, F. Martínez, Solubility and solution thermodynamics of some sulfonamides in 1-propanol + water mixtures, *J. Solution Chem.*, **43**, 836-852 (2014), doi: 10.1007/s10953-014-0169-0.
47. D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of some structurally related sulfonamides in 1-propanol + water co-solvent mixtures, *Phys. Chem. Liq.*, **53**, 293-306 (2015), doi: 10.1080/00319104.2014.961191.
48. G.I. Egorov, D.M. Makarov, A.M. Kolker, Volumetric properties of the water-ethylene glycol mixtures in the temperature range 278-333.15 K at atmospheric pressure, *Russ. J. Gen. Chem.*, **80**, 1577-1585 (2010), doi: 10.1134/S1070363210080074.
49. R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The .alpha.-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2886-2894 (1976), doi: 10.1021/ja00426a036.
50. M.J. Kamlet, R.W. Taft, The Solvatochromic Comparison Method. I. The .beta.-Scale Of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 377-383 (1976), doi: 10.1021/ja00418a009.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

M.S. Vargas-Santana, A.M. Cruz-González, N.E. Cerquera, A.S. Escobar-Rodríguez, R.E. Cárdenas, O. Calderón-Losada, C.P. Ortiz, D.R. Delgado, Extended Hildebrand solubility approach and Yalkowsky-Roseman model for estimating the solubility of sulfadiazine and sulfamethazine in some {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 812-836 (2021).

Histomorphometric analysis in HPV-induced cervical lesions

Emanuelly Bernardes-Oliveira¹, Kleyton Thiago Costa de Carvalho², Ricardo Ney Oliveira Cobucci², Ana Katherine Gonçalves², Deyse de Souza Dantas^{2,3*}, Janáina Cristiana de Oliveira Crispim²

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM) Natal/RN, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Maternidade Escola Januário Cicco Natal/RN, Brasil.

³ Universidade Federal do Amapá, Macapá/AP, Brasil.

*Autor for correspondence: deysesdantas@yahoo.com.br

Received: March 20, 2020

Corrected: April 30, 2021

Accepted: May 7, 2021

SUMMARY

Introduction: squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix involve dysplastic change, or abnormal cell maturation and their progression can result in cervical carcinoma. Some studies have reported the importance of the immune system in the process of tumor progression. Therefore, it is important to characterize the inflammatory infiltration as a possible marker of prognosis. **Aim:** to analyze density of the inflammatory infiltrate in different degrees of SIL and in cervical cancer to understand local and systemic changes in the interactions between HPV associated cervical lesions and the immune system. **Methods:** one hundred and eight (108) cervical biopsy specimens were obtained from patients treated at the tertiary hospital and were stratified into four groups: Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), cervical cancer (CC) and negative for intraepithelial lesion and malignancy (NILM). Histomorphometric analysis was performed from the identification and quantification of inflammatory cells in ten (10) fields per sample in images captured by a digital system and analyzed using the software Leica Qwin Pro V 3.5.1, Leica Microsystems Ltd. Differences between groups were evaluated by Anova followed by Tukey test. Tests yielding *p* values < 0.05 were considered significant. **Results:** we found a significant increase in the average number of lymphocytes (cells/mm² and cells/field) in samples of CC

in relation to the other groups. No statistical difference was observed in relation to neutrophils, plasma cells and eosinophils. **Conclusion:** cervical cancer specimens had significantly more lymphocytes than NILM, or LSIL and HSIL, suggesting that this cell type plays a central role in cellular immunity against cervical carcinoma.

Key-words: Lymphocytes, plasmocyte cells, eosinophils, cervical cancer.

RESUMEN

Análisis histomorfométrico en lesiones cervicales inducidas por VPH

Introducción: las lesiones escamosas intraepiteliales (SIL) del cuello uterino implican cambios displásicos o maduración celular anormal y su progresión puede resultar en carcinoma cervical. Algunos estudios han informado de la importancia del sistema inmunológico en el proceso de progresión tumoral. Por tanto, es importante caracterizar la infiltración inflamatoria como un posible marcador de pronóstico. **Objetivo:** analizar la densidad del infiltrado inflamatorio en diferentes grados de SIL y en cáncer de cuello uterino para comprender los cambios locales y sistémicos en las interacciones entre las lesiones cervicales asociadas al VPH y el sistema inmunológico. **Métodos:** se obtuvieron ciento ocho (108) muestras de biopsia cervical de pacientes tratados en el hospital terciario y se estratificaron en cuatro grupos: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), cáncer de cuello uterino (CC) y negativo para lesiones intraepiteliales y malignidad (NILM). El análisis histomorfométrico se realizó a partir de la identificación y cuantificación de células inflamatorias en diez (10) campos por muestra en imágenes capturadas por un sistema digital y analizadas utilizando el software Leica Qwin Pro-V 3.5.1, Leica Microsystems Ltd. Anova seguido de la prueba de Tukey. Las pruebas que arrojaron valores de $p < 0,05$ se consideraron significativas. **Resultados:** encontramos un aumento significativo en el número medio de linfocitos (células/mm² y células/campo) en muestras de CC en relación con los otros grupos. No se observó diferencia estadística en relación con neutrófilos, células plasmáticas y eosinófilos. **Conclusión:** las muestras de cáncer de cuello uterino tenían significativamente más linfocitos que NILM o LSIL y HSIL, lo que sugiere que este tipo de células juega un papel central en la inmunidad celular contra el carcinoma de cuello uterino.

Palabras clave: Linfocitos, células plasmocitarias, eosinófilos, cáncer de cuello uterino.

RESUMO

Análise histomorfométrica em lesões cervicais induzidas por HPV

Introdução: Lesões intraepiteliais escamosas (SIL) do colo do útero envolvem alteração displásica ou maturação celular anormal e sua progressão pode resultar em carcinoma cervical. Alguns estudos relatam a importância do sistema imunológico no processo de progressão tumoral. Portanto, é importante caracterizar o infiltrado inflamatório como um possível marcador de prognóstico. **Objetivo:** analisar a densidade do infiltrado inflamatório em diferentes graus de SIL e no câncer cervical para compreender as alterações locais e sistêmicas nas interações entre as lesões cervicais associadas ao HPV e o sistema imunológico. **Métodos:** Cento e oito (108) espécimes de biópsia cervical foram obtidos de pacientes tratados no hospital terciário e foram estratificados em quatro grupos: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), câncer cervical (CC) e negativo para lesão intraepitelial e malignidade (NILM). A análise histomorfométrica foi realizada a partir da identificação e quantificação das células inflamatórias em dez (10) campos por amostra em imagens capturadas por um sistema digital e analisadas no software Leica Qwin Pro V 3.5.1, Leica Microsystems Ltd. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por Anova seguida do teste de Tukey. Os testes com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** encontramos um aumento significativo no número médio de linfócitos (células/mm² e células/campo) nas amostras de CC em relação aos demais grupos. Não foi observada diferença estatística em relação aos neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos. **Conclusão:** as amostras de câncer cervical tinham significativamente mais linfócitos do que NILM, ou LSIL e HSIL, sugerindo que este tipo de célula desempenha um papel central na imunidade celular contra o carcinoma cervical.

Palavras-chave: Linfócitos, células plasmocitárias, eosinófilos, câncer cervical.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is a serious public health problem [1]. Despite the advances in diagnostic techniques and the inclusion of the Pap smear as a screening [2] and control measure for CC, more than 530 000 new cases are estimated annually in women worldwide [3]. In Brazil, this type of cancer is the fourth leading cause of cancer-related mortality amongst Brazilian women [4] According to the National Cancer Institute, for the biennium 2018-2019 there will be an estimated 16 370 cases of CC per 100 000 women [5].

Currently, more than 200 types of human papillomavirus (HPV) have already been cataloged [6, 7], there being 15 subtypes with oncogenic power [8, 9], which cause 80% of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), and 90% of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) [10]. These subtypes are present in 99% of cases of CC [11, 12], with the HPV genotypes 16 and 18 being the most prevalent worldwide [13]. About 90% of immunocompetent women infected with some oncogenic HPV subtype have a spontaneous immune response, which plays a key role in eliminating the virus within three and a half years, however, 1% of these women progress to the development of invasive CC [14].

In recent years, different studies have demonstrated the important role of the immune system in controlling tumor growth and progression [15]. It is known that the uterine cervix is a favorable organ for HPV infections, promoting an innate and adaptive immune response [16]. This cell-mediated response is fundamental for the control of infections, progression of cervical lesions and malignancy HPV-associated disease [14, 17].

In recent years, different studies have demonstrated the important role of the immune system in controlling tumor growth and progression [15]. This cell-mediated response is fundamental to avoid squamous intraepithelial lesions (SIL) and malignant HPV-associated disease [14, 16]. However, a virus with an imbalance of the host immune response, promotes several escape mechanisms, inhibits the action of antigen-presenting cells and the manipulation of Th1/Th2 polarization [17]. Moreover, when chronic inflammation persists in the cervical microenvironment, immune responses play a critical role during HSIL progression [18]. In other studies, it was observed that inflammation is considered a key point for the development of different cancers, acting on tumor progression, stimulating cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis [19, 20]. This may occur due to suppression at the tumor site, via antitumor and pro-inflammatory response [21, 22].

In addition to this, some cytotoxic cytokines are activated, promoting signaling and agglomeration of (CD) 4+ T helper cells. Unlike regulatory T cells, Forkhead box P3 + (FOXP3 +) T cells suppress the immune response of other cells, inhibiting the inflammatory process [23].

In another study, it was also reported that monocytes, eosinophils and dendritic cells (DC) could be observed in biopsies of nasopharyngeal carcinoma [24]. While in rectal cancer, several markers of innate and adaptive immune response have been observed, resulting in cell infiltration [25]. In addition, other cells such as fibroblasts can activate some infiltrating inflammatory cells, favoring the growth of cancer cells and allowing metastatic dissemination [26].

Recently, several studies have shown that the increase of inflammatory cells, such as neutrophils and lymphocytes in the peripheral blood is a good indicator for different cancers, but *in situ* studies are scarce [27]. As the collection of cytology and biopsy material from the cervix is easy to access, the need to understand the local response is of great relevance.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the plasma density of inflammatory infiltrate cells in biopsy specimens of women with or without HPV-induced cervical lesions.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval

The study received approval from the institutional board of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) (protocol N.º 526/11).

Subject

For this study, 108 women were recruited in the Cervical Pathology outpatient clinic of a tertiary hospital. All recruited women received detailed information regarding the objective of the study and gave written consent to participate.

Sample collection and Cytology

Histopathological analysis was performed on sections from paraffin blocks of 4 µm thickness and stained with hematoxylin/eosin. All analyzes followed the criteria established according to the Bethesda Classification. These specimens were stratified into four groups: Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), cervical cancer (CC) and negative for intraepithelial lesion and malignancy (NILM). All biopsies were done with hematoxylin and eosin (HE) and analyzes were performed by two independent pathologists.

The morphometric analysis was performed from the identification and quantification of inflammatory cells in ten random fields per sample. The representative images of the stroma of the cervix biopsies were taken at 400X magnification using a digital camera attached to the histomorphometric microscope. Each chosen field has an area of 0.066 mm². These images of the biopsies samples were captured by a digital system and analyzed using the Leica Qwin Pro V 3.5.1 software, from Leica Microsystems Ltd (Switzerland, Whisker). The morphometric parameters were the number of lymphocytes, plasmocytes, neutrophils and eosinophils. The number of cells per parameter counted in areas of stroma was obtained for each case.

Statistical analysis

The differences between groups were assessed using parametric Anova and Tukey Multiple Comparison Test. Mean and minimum–maximum for each morphometric parameter were obtained. Anova test was used to determine if there were statistically significant differences between the number of cells per field and per mm² counted in the stroma among NILM, LSIL, HSIL and CC groups. Tests yielding p-values <0.05 were considered significant. We used the Graphpad Prism 5.0.

RESULTS

Demographic and clinic characteristics of the study participants by the histological group did not show statistical differences between age (years), age at first intercourse, number of lifetime sexual partners, ethnicity, education level, contraceptive method, alcohol use and smoking habit (table 1).

Table 1. Demographic and clinicopathological characteristics observed in patients with cervical lesion and cancer.

Category	NILM	LSIL	HSIL	CC
Age (years)	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Mean ± SD	40.0 ± 10.8	34.0 ± 12.1	35.0 ± 10.1	43.0 ± 11.93
Age at first intercourse (years)	N = 24	N = 40	N = 10	N = 11
Mean ± SD	18 ± 2.5	18.4 ± 3.0	18.9 ± 6.0	15.0 ± 3.9
Lifetime sexual partners	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
0-1 (%)	10 (41.60)	20(50.00)	3 (27.27)	3 (23.07)
2-3 (%)	12 (50.00)	16(40.00)	4 (36.36)	5 (38.46)
4-5 (%)	01(4.1)	4(10.00)	2 (18.18)	2 (15.38)
6 + (%)	1 (4.1)	0 (0)	2 (18.18)	3 (23.07)
Ethnicity	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Caucasian (%)	17(70.80)	24(60.00)	3 (27.27)	3 (23.07)
Non-Caucasian (%)	7(29.20)	16(40.00)	8 (72.72)	10 (76.92)
Education level	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Illiterate (%)	1 (4.1)	2 (5.0)	2(18.18)	3 (23.07)
Elementary (%)	11(45.8)	15 (37.5)	4 (36.36)	8 (61.53)
High school (%)	10 (41.6)	10 (25.0)	5 (45.45)	2 (15.38)
University (%)	2 (8.3)	3 (7.5)	0 (0)	0 (0)

Category	NILM	LSIL	HSIL	CC
Contraceptive method	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Oral contraceptives (%)	10(41.66)	22 (55.55)	3 (27.27)	3 (23.07)
Injectable contraceptives (%)	1 (4.16)	0(0)	0 (0)	2 (18.18)
Sterilization (%)	5 (20.83)	15(37.5)	0 (0)	0 (0)
Condom use (%)	5 (20.83)	13(32.5)	2 (18.18)	0 (0)
No method (%)	3 (12,5)	0 (0)	6 (54.54)	8 (61.53)
Alcohol use	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Yes (%)	5 (20.83)	12 (30.00)	4 (36.36)	4 (30.76)
No (%)	19(79.16)	28(70.00)	7 (63.64)	9 (69.23)
Smoking habit	N = 24	N = 40	N = 11	N = 13
Yes (%)	3 (12.50)	1 (2.5)	2 (18.18)	3 (22.22)
No (%)	21 (87.50)	39 (97.50)	9 (81.81)	10 (77.78)

NILM: negative for intraepithelial lesion malignancy; LSIL: *Squamous intraepithelial lesion*; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; CC: cervical cancer.

In the analysis by cells/mm² density, the mean of lymphocytes was significantly higher in the CC group when compared with LSIL, HSIL and NILM groups (table 2 and figure 1a). The analysis demonstrated a significant increase in the number of lymphocytes among the CC group. However, no difference between the number of neutrophil cells, plasmocytes cells and eosinophils was observed among the groups figure 1b, 1c and 1d).

Table 2. Quantitative distribution (mean, minimum and maximum) in the number of inflammatory cells (cells/mm²) in cervical precursor lesions and cancer.

Specimens	Mean [minimum-maximum]			
	Lymphocytes	Plasmocytes	Neutrophils	Eosinophils
NILM (n = 24)	144.1 [9.10-628.8]	47.0 [0.0-675.8]	17.3 [0.0-56.1]	3.8 [0.0-21.2]
LSIL (n =40)	195.8 [4,5-860.6]	102 [0.0-1149]	22.7 [0.0-193.9]	2.2 [0.0-13.6]
HSIL (n=20)	239.5 [78,80-1480]	124 [0.0-640.9]	67.6 [0.0-472.7]	4.0 [0.0-42.4]
CC (n=13)	468.76 [87.9-1176]* ^a	381.4 [1.5-1044]	69.7 [1.50-713.6]	14.4 [0.0 -62.10]

NILM: negative for intraepithelial lesion malignancy; LSIL: *Squamous intraepithelial lesion*; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; CC: cervical cancer.

*^a Tests yielding *p-values* <0.05 were considered significant.

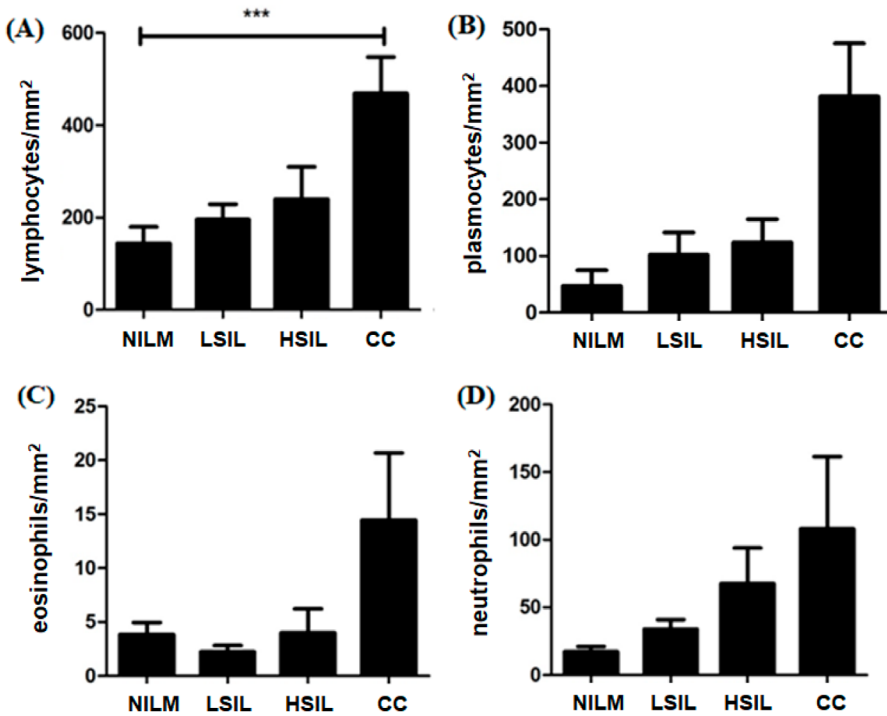


Figure 1. Significant increase in mean number density (cells/mm²) of lymphocytes were found in CC patients compared to NILM patients (A). Comparing the average number (cells/mm²) of plasmacytes (B), eosinophils (C), neutrophils (D) and cells of LSIL, HSIL and CC patients with NILM showed no statistical significance. (A)*** Tests yielding *p-values* <0.05 were considered significant.

NILM: negative for intraepithelial lesion malignancy; LSIL: *squamous intraepithelial lesion*; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; CC: cervical cancer.

DISCUSSION

During this study, we histomorphometrically analyzed the density of immunoinflammatory cells in cervical microenvironment of women with different degrees of *SIL* and CC. We verified that CC biopsy specimens had a significant increase in the number of lymphocytes compared with NILM, LSIL and HSIL.

The immune response is extremely important in restraining these neoplastic cells, and failures in this system may lead to cancer progression [14]. In this case, the presence of cytotoxic lymphocytes is beneficial to the patient concerning HPV virus elimination,

providing protection against tumor progression, since the specialty of this cell type is the immune response against viruses [14, 17].

However, other studies have found that the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in the uterine cervix induced the migration of these cells into the tumoral environment and is directly proportional to the progression of the uterine lesions, proving to be a type of ineffective response, which enables the neoplastic progression of CC [28].

Previously, a cohort study demonstrated an association between the decreased number of lymphocytes and the increased risk of relapse in cervical cancer, confirming the importance of the immune system in immunosurveillance to prevent progression of the *intraepithelial lesion* [26].

Recently, a greater presence of CD4+ and CD8+ lymphocytes was detected in the tumor tissue of the uterine cervix, when compared to those found in the peripheral blood [29].

In another study, it was analyzed that the presence of the Treg cells in the TIL can cancel the cytotoxicity of the NK cells [30]. Evidence indicates that B cells play a significant role in antitumor immune responses. Although only low numbers of B cells infiltrate premalignant lesions, these cells may exert a distant effect on oncogenesis by secreting antibodies, which are deposited at the tumor site in the form of immune complexes [31]. Researchers found lower amounts of CD20 in patients with *SIL* and in intratumoral tissue; however, it is present at increased levels in the peritumoral stroma. B cells do not seem to act directly on the tumor tissue, but at a distance, through the secretion of antibodies [32].

In another study, there was an increase in eosinophil infiltrates and their density increased according to the progression of cervical cancer [33]. The presence of eosinophils is reported as a prognostic biomarker in CC [34, 35]. In our results, despite the absence of statistical significance, we found an increase in cancer samples compared to the *LSIL*. Our findings corroborate with those of Spiegel *et al.* [36], which associated the presence of eosinophils with the capability to invade CC, in a retrospective study. Van Driel *et al.* [37] also demonstrated an increased influx of eosinophils in cancer samples and correlated this with a loss of effective immunity. In a later study, the presence of eosinophils correlated tumors with local secretion of IL-4, a Th2 profile of interleukin which is typically anti-inflammatory [38]. In the double-labeling immunohistochemistry, it was shown that cells expressing IL-4 were also CD3+. These findings suggest that the presence of an eosinophilic infiltrate is mediated by IL-4 and is a result of a type 2 response mediated by CD3+ T lymphocytes.

This study has some limitations; firstly, it was a cross-sectional study with a small sample size. Secondly, we were unable to adjust for certain critical confounders such as

systemic infection or inflammation, and the number of lymphocytes, plasmocytes, neutrophils and eosinophils may have been affected by the presence of other systemic diseases.

The study was designed with a collection of slides that were in the Department of Pathology/UFRN, the images were captured in the Laica histomorphological microscope, but due to time, we had losses of the images saved on the computer. At the present moment we were unable to recover the images referring to this study.

CONCLUSION

Cervical cancer biopsy specimens had significantly more lymphocytes / mm² than NILM, LSIL and HSIL. The role of tumor-infiltrating lymphocytes is not yet well established. Studies demonstrate that CD3 + lymphocyte infiltrates correlate with the presence of metastases at diagnosis, while CD4 + and CD20 + lymphocytes are related to the characteristics of better prognosis in CC. Some studies emphasize the importance of infiltration of FoxP3 + lymphocytes (regulatory T) and their correlation with characteristics of tumor aggressiveness, tumor size and presence or absence of invasion, but further studies in patients with CC and SIL are important to better understand the role of this immunomodulation represented by tumor-infiltrating lymphocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the tertiary hospital, in the State of Rio Grande do Norte, Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest are disclosed.

REFERENCES

1. Y. Chen, H. Wang, W. Lin, P. Shuai, ADAR1 overexpression is associated with cervical cancer progression and angiogenesis, *Diagn. Pathol.*, 12(1), 12 (2017).

2. K.S. Tewari, B.J. Monk, New strategies in advanced cervical cancer: from angiogenesis blockade to immunotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **20**(21), 5349-5358 (2014).
3. N.S.L. Yeo-Teh, Y. Ito, S. Jha, High-risk human papillomaviral oncogenes E6 and E7 target key cellular pathways to achieve oncogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(6), E1706 (2018).
4. R.F.A. Costa, A. Longatto-Filho, F. de Lima-Vazquez, C. Pinheiro, L.C. Zeferino, J.H.T.G. Fregnani, Trend analysis of the quality indicators for the Brazilian cervical cancer screening programme by region and state from 2006 to 2013, *BMC Cancer*, **18**(1), 126 (2018).
5. INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 2017.
6. A. Pańczyszyn, E. Boniewska-Bernacka, G. Głąb, Telomeres and telomerase during human papillomavirus-induced carcinogenesis, *Mol. Diagn. Ther.*, **22**(4), 421-430 (2018).
7. Y.Q. Wang, J.L. Lu, Y.R. Liang, Q.S. Li, Suppressive effects of EGCG on cervical cancer, *Molecules*, **23**(9), E2334 (2018).
8. S. Rashid, S. Labani, B.C. Das, Knowledge, awareness and attitude on HPV, HPV vaccine and cervical cancer among the college students in India, *PLoS One*, **11**(11), e0166713 (2016).
9. A.P. Ferreira-Costa, A.K. Gonçalves, P.R.L. Machado, L.B.C. Souza, A. Sarmiento, R.N.O. Cobucci, P.C. Giraldo, S.S. Witkin, Immune response to human papillomavirus one year after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: HPV-specific IgG and IgA antibodies in the circulation and the cervix, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **19**(8), 2313-2317 (2018).
10. A. Albawardi, M.R. Quddus, S. Al Awar, S. Almarzooqi, Frequency of rare and multi viral high-risk HPV types of infection in cervical high grade squamous intraepithelial lesions in a non-native dominant Middle Eastern country: a polymerase chain reaction-based pilot study, *Diagn. Pathol.*, **13**, 42 (2018).
11. X. Wang, X. Huang, Y. Zhang, Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer, *Front. Microbiol.*, **9**, 2896 (2018).

12. L. Yao, M. Yuan, J. Yuan, P. Zhou, L. Mei, J. Cheng, Analysis of cervical human papillomavirus infection in 2300 women in Urumqi, China, *Medicine (Baltimore)*, **97**(45), e13206 (2018).
13. J. Zhang, C. Burn, K. Young, M. Wilson, K. Ly, M. Budhwani, A. Tschirley, A. Braithwaite, M. Baird, M. Hibma, Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response, *Sci. Rep.*, **8**(1), 2373 (2018) .
14. A.A. Bashaw, G.R. Leggatt, J. Chandra, Z.K. Tuong, I.H. Frazer, Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection, *Papillomavirus Res.*, **4**, 58-65 (2017).
15. A. Lechner, H. Schlößer, S.I. Rothschild, M. Thelen, S. Reuter, Zentis P, *et al.*, Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune check-point molecules in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, **8**(27), 44418-44433 (2017).
16. E. Ancuta, S. Buțureanu, F. Zugun-Eloae, C.R. Anton, C. Ancuta, D. Dițescu, E. Anton, Potential value of *in situ* cellular immune response in HPV subtype 16 and 18 positive cervical cancer, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **55**(3), 817-822 (2014).
17. J.P.P. Alve, T.A.A. de Medeiros-Fernandes, J.M.G. de Araújo, R.N.O. Cobucci, D.C.F. Lanza, F.L. Bezerra, V.S. Andrade, J.V. Fernandes, Th17 response in patients with cervical cancer, *Oncol Lett.*, **16**(5), 6215-6227 (2018).
18. S. Smola, Immunopathogenesis of HPV-associated cancers and prospects for immunotherapy, *Viruses*, **9**(9), E254 (2017).
19. R.R. Zheng, M. Huang, C. Jin, H.C. Wang, J.T. Yu, L.C. Zeng, F.Y. Zheng, F. Lin, Cervical cancer systemic inflammation score: a novel predictor of prognosis, *Oncotarget*, **7**(12), 15230-15242 (2016).
20. B. Bojaxhiu, A.J. Templeton, O. Elicin, M. Shelan, K. Zaugg, M. Walser, R. Giger, D.M. Aebersold, A. Dal-Pra, Relation of baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio to survival and toxicity in head and neck cancer patients treated with (chemo-) radiation, *Radiat. Oncol.*, **13**(1), 216 (2018).
21. T. Schweiger, A.S. Berghoff, C. Glogner, O. Glueck, O. Rajky, D. Traxler, P. Birner, M. Preusser, W. Klepetko, K. Hoetzenecker, Tumor-infiltrating lymphocyte subsets and tertiary lymphoid structures in pulmonary metastases from colorectal cancer, *Clin. Exp. Metastasis*, **33**(7), 727-739 (2016).

22. Q.T. Huang, Q.Q. Man, J. Hu, Y.L. Yang, Y.M. Zhang, W. Wang, M. Zhong, Y.H. Yu, Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies, *Oncotarget*, **8**(10), 16755-16764 (2017).
23. F. Noble, T. Mellows, L.H. McCormick-Matthews, A.C. Bateman, S. Harris, T.J. Underwood, *et al.*, Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**(6), 651-662 (2016).
24. J. Lu, X.M. Chen, H.R. Huang, F.P. Zhao, F. Wang, X. Liu, X.P. Li, Detailed analysis of inflammatory cell infiltration and the prognostic impact on nasopharyngeal carcinoma, *Head Neck*, **40**(6), 1245-1253 (2018).
25. M.Z. Wu, W.N. Li, N. Cha, L.X. Tian, Y.I. Zhang, X. Wu, K.J. Guo, G.P. Wu, Diagnostic utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA quantitative expression for cervical cells of patients with dysplasia and carcinoma, *Cell Transplant.*, **27**(9), 1401-1406 (2018).
26. S. Chun, K. Shin, K.H. Kim, H.Y. Kim, W. Eo, J.Y. Lee, J. Namkung, S.H. Kwon, S.B. Koh, H.B. Kim, The neutrophil-lymphocyte ratio predicts recurrence of cervical intraepithelial neoplasia, *J. Cancer*, **8**(12), 2205-2211 (2017).
27. V. Kaya, M. Yıldırım, G. Yazıcı, A.Y. Yalçın, N. Orhan, A. Güzel, Prognostic significance of indicators of systemic inflammatory responses in glioblastoma patients, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **18**(12), 3287-3291 (2017).
28. Y. Liang, W. Lü, X. Zhang, B. Lü, Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer, *Diagn. Pathol.*, **13**(1), 93 (2018).
29. D. Das, B. Sarkar, S. Mukhopadhyay, C. Banerjee, S. Biswas-Mondal, An altered ratio of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in cervical cancer tissues and peripheral blood – A prognostic clue? *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **19**(2), 471-478 (2018).
30. W.C. Chang, C.H. Li, L.H. Chu, P.S. Huang, B.C. Sheu, S.C. Huang, Regulatory T cells suppress natural killer cell immunity in patients with human cervical carcinoma, *Int. J. Gynecol. Cancer*, **26**(1), 156-162 (2016).

31. A.K. Mishra, T. Kadoishi, X. Wang, E. Driver, Z. Chen, X.J. Wang, J.H. Wang, Squamous cell carcinomas escape immune surveillance via inducing chronic activation and exhaustion of CD8+ T Cells co-expressing PD-1 and LAG-3 inhibitory receptors, *Oncotarget*, **7**(49), 81341-81356 (2016).
32. C.S. Silva, M.A. Michelin, R.M. Etchebehere, S.J. Adad, E.F. Murta, Local lymphocytes and nitric oxide synthase in the uterine cervical stroma of patients with grade III cervical intraepithelial neoplasia, *Clinics (Sao Paulo)*, **65**(6), 575-581 (2010).
33. F. Xie, L.B. Liu, W.Q. Shang, K.K. Chang, Y.H. Meng, J. Mei, J.J. Yu, D.J. Li, M.Q. Li, The infiltration and functional regulation of eosinophils induced by TSLP promote the proliferation of cervical cancer cell, *Cancer Lett.*, **364**(2):106-117 (2015).
34. G. Varricchi, M.R. Galdiero, S. Loffredo, V. Lucarini, G. Marone, F. Mattei, G. Marone, G. Schiavoni, Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology*, **7**(2), e1393134 (2017).
35. K. Holub, A. Biete, Impact of systemic inflammation biomarkers on the survival outcomes of cervical cancer patients, *Clin. Transl. Oncol.*, **21**, 836-844 (2019).
36. G.W. Spiegel, M. Ashraf, J.J. Brooks, Eosinophils as a marker for invasion in cervical squamous neoplastic lesions, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **21**(2), 117-124 (2002).
37. W.J. Van Driel, P.C. Hogendoorn, F.W. Jansen, A.H. Zwinderman, J.B. Trimpos, G.J. Fleuren, Tumor-associated eosinophilic infiltrate of cervical cancer is indicative for a less effective immune response, *Hum. Pathol.*, **27**(9), 904-911 (1996).
38. W.J. Van Driel, P. Kievit-Tyson, L.C. van den Broek, A.H. Zwinderman, B.J. Trimpos, G.J. Fleuren, Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response, *Gynecol. Oncol.*, **74**(2), 188-195 (1999).

HOW TO CITE THIS ARTICLE

E. Bernardes-Oliveira, K.T. Costa de Carvalho, R.N. Oliveira-Cobucci, A.K. Gonçalves, D. de Souza-Dantas, J.C. de Oliveira-Crispim, Histomorphometric analysis in HPV-induced cervical lesions, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **50**(3), 837-850 (2021).

O potencial antimicrobiano do carveol: uma revisão integrativa

Gustavo Fernandes Queiroga Moraes¹, Girlene Macena Santos², Franciele Maiara de Araújo Castro³, Igara Oliveira Lima^{4*}

Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brasil.

Correios eletrônicos:

¹gustavoo.queiroga@gmail.com

²gyrlenemacena@gmail.com

³francielecastroufcg@gmail.com

^{4*}Autora correspondente: igara.oliveira@professor.ufcg.edu.br

Recebido: 3 de março de 2021

Revisado: 1 de maio de 2021

Aceto: 7 de maio de 2021

RESUMO

Objetivo: realizar uma revisão bibliográfica sobre o potencial antimicrobiano do carveol. É uma revisão integrativa entre os anos de 2010-2020 nas bases de dados BVS, PubMed, SciELO, ScienceDirect e Web of Science. **Metodologia:** dos 2753 artigos recuperados nas bases de dados, apenas 5 foram selecionados para compor os resultados, sendo os gêneros mais estudados *Candida*, *Staphylococcus* e *Escherichia*. A técnica de microdiluição em caldo foi a metodologia mais utilizada para determinar sua ação. Em termos de MIC, para a maioria das espécies, foram excelentes. Em relação ao teste Time-kill, o carveol teve um excelente desempenho na concentração de 4 x MIC, que mostrou uma redução de UFC de 6 log em 2 horas. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a utilização do método Checkboard. Além disso, este composto apresentou boa atividade antibiofilme contra bactérias *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** o possível mecanismo de ação da atividade antimicrobiana do carveol ocorre por meio dos graves danos causados às membranas citoplasmáticas, o que favorecerá a lise celular. Dessa forma, existem poucos estudos na coleção científica disponível que abordem o assunto, sendo necessária a realização de mais estudos *in vitro* e *in vivo* para melhor elucidar sua ação.

Palavra chave: Monoterpenos, carveol, atividade antibacteriana, atividade antifúngica.

SUMMARY

The antimicrobial potential of carveol: an integrative review

Aim: to carry out a bibliographic review on the antimicrobial potential of carveol. It is an integrative review between the years 2010-2020 in the BVS, PubMed, SciELO, ScienceDirect and Web of Science databases. **Methodology:** of the 2753 articles retrieved from the databases, only 5 were selected to compose the results, the most studied genera being *Candida*, *Staphylococcus* and *Escherichia*. The broth microdilution technique was the most widely used methodology to determine its action. In terms of MIC, for most species, they were excellent. Regarding the Time-kill test, carveol had an excellent performance at a concentration of 4 x MIC, which showed a reduction of CFU by 6 log in 2 hours. No studies have been found in the literature on the use of the Checkboard method. Furthermore, this compound had good antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Results:** the possible mechanism of action of the antimicrobial activity of carveol occurs through the severe damage caused to the cytoplasmic membranes, which will favor cell lysis. Thus, there are few studies in the available scientific collection that address the subject, so it is necessary to carry out more in vitro and in vivo studies to better elucidate its action.

Key-words: Monoterpenes, carveol, antibacterial activity, antifungal activity.

RESUMEN

El potencial antimicrobiano del carveol: una revisión integradora

Objetivo: realizar una revisión bibliográfica sobre el potencial antimicrobiano del carveol. Se trata de una revisión integradora entre los años 2010-2020 en las bases de datos de BVS, PubMed, SciELO, ScienceDirect y Web of Science. **Metodología:** de los 2753 artículos recuperados de las bases de datos, solo se seleccionaron 5 para componer los resultados, siendo los géneros más estudiados *Candida*, *Staphylococcus* y *Escherichia*. La técnica de microdilución en caldo fue la metodología más utilizada para determinar su acción. En cuanto a CIM, para la mayoría de las especies, fueron excelentes. En cuanto al ensayo Time-kill, el carveol tuvo un excelente desempeño a una concentración de 4 x MIC, que mostró una reducción de UFC en 6 log en 2 horas. No se ha encontrado ningún estudio en la literatura sobre el uso del método Checkboard. Además, este compuesto tenía una buena actividad antibiofilm contra la bacteria *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** el posible mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana del carveol se produce a través del severo daño causado

en las membranas citoplasmáticas, lo que favorecerá la lisis celular. Así, son pocos los estudios en la colección científica disponible que abordan el tema, por lo que es necesario realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* para dilucidar mejor su acción.

Palabras clave: Monoterpénicos, carveol, actividad antibacterial, actividad antifúngica.

INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, as plantas medicinais foram utilizadas, de modo alternativo, para o tratamento de distintas afecções. Assim, devido aos seus respectivos históricos clínicos e subsequentes estudos etnofarmacológicos, representam uma importante fonte de descoberta a novos fármacos atualmente [1-3].

Os óleos essenciais compreendem ao conjunto de metabólitos secundários, caracterizados por apresentar odores intensos, serem lipofílicos, voláteis e possuírem um promissor potencial farmacológico, os quais são extraídos de diversas partes da planta, mediante a técnica de arraste a vapor. A constituição química destas substâncias aromáticas diversifica-se de acordo com as espécies vegetais, entretanto, os fenilpropanóides e terpenos são os mais encontrados [4-7].

Nesse sentido, os terpenos correspondem a uma classe de compostos naturais formadas através da agregação de moléculas de isopreno (C_5H_8), em que são classificadas em subgrupos, sendo estes os monoterpenos (C_{10}), sequiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), terpenos ésteres (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e terpenos superiores ($>C_{30}$), segundo o quantitativo de unidades de isoprenos. Os monoterpenos, por sua vez, são frequentemente encontrados nos óleos essenciais, compondo 90% de sua composição. Evidenciam-se nestes fitoconstituintes uma grande variedade estrutural, dessa forma, podendo ter cadeias carbônicas alifáticas, monocíclicas [8-13].

Carveol ($C_{10}H_{16}O$) é um monoterpeno monocíclico, o qual contém em sua fórmula molecular um álcool secundário [14]. Além disso, faz parte da constituição de diversos óleos voláteis, no entanto, como produto majoritário, destacam-se *Etlíngera sayapensis* (13, 49%) [15] e *Mentha spicata* L. (24, 3%) [16].

Estudos presentes no acervo científico disponível comprovam a eficácia deste fitoconstituinte como antioxidante [17], vasorelaxante [18], antinicotínico [19], antimicrobiano [20], anti-inflamatório [21], nematicida [22], anticâncer [23] e antinociceptivo [24].

Na literatura, a atividade antimicrobiana deste monoterpeno, já é discutida, entretanto, pouco se tem sobre o assunto. À vista disso, o presente estudo tem como finalidade realizar uma revisão integrativa acerca do potencial antimicrobiano do carveol.

METODOLOGIA

Delineamento do estudo

Trata-se de uma revisão do tipo integrativa, com o propósito de possibilitar a reunião de diversos estudos, os quais incluem a uma minuciosa investigação de importantes pesquisas que contribuem para tomada de decisões e aperfeiçoamento da prática clínica [25].

Para o direcionamento do estudo foi formulado a seguinte pergunta: O carneol apresenta uma atividade antimicrobiana promissora?

Critérios de elegibilidade

Foram incluídos artigos publicados entre os anos de 2010 a 2020, sobre a atividade antimicrobiana do carneol e que tivessem sido publicados nas línguas inglesa, portuguesa e/ou espanhola. Pesquisas realizadas em tempo cronológico desconforme do delimitado, pela qual não apresentava a atividade antimicrobiana do carneol de modo isolado, evidenciava outras atividades farmacológicas, eram revisões da literatura, livros, capítulos de livros, ou que ainda, abordassem acerca de assuntos não pertinentes ao proposto, foram excluídos.

Fontes de informação

Os artigos foram recuperados a partir das bases de dados: BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), *PubMed*, *SciELO (Scientific Electronic Library Online)*, *ScienceDirect* e *Web of Science*. O levantamento dos dados ocorreu entre março de 2020 a dezembro de 2020.

Estratégia de busca

A estratégia de busca aplicada para pesquisa nas bases de dados se deu pela utilização dos seguintes descritores e palavras-chave: “(*antimicrobial activity*) AND (carveol)”, “(atividade antimicrobiana) AND (carveol)”, “(*antifungal activity*) AND (carveol)”, “(atividade antifúngica) AND (carveol)”, “(*antibacterial activity*) AND (carveol)”, “(atividade antibacteriana) AND (carveol)”, “((*antimicrobial activity*) AND (carveol)) AND *association*”, “((atividade antimicrobiana) AND (carveol)) AND associação”, “((*antifungal activity*) AND (carveol)) AND *association*”, “((atividade antifúngica) AND (carveol)) AND associação”, “((*antibacterial activity*) AND (carveol)) AND *association*”, “((atividade antibacteriana) AND (carveol)) AND associação”, “((*antimicrobial activity*) AND (carveol)) AND *Checkborad method*”, “((atividade antimicrobiana) AND (carveol)) AND método de *Checkboard*”, “((*antifungal activity*) AND (carveol)) AND *Checkborad method*”, “((atividade antifúngica) AND (carveol)) AND método de *Checkboard*”, “((*antibacterial activity*) AND (carveol)) AND *Checkborad method*”, “((atividade antibacteriana) AND (carveol)) AND método de *Checkboard*”, “((*time kill kinetic assay*)

AND (carveol)) AND antimicrobial activity”, “((time kill kinetic assay) AND (carveol)) AND antifungal activity”, “((time kill kinetic assay) AND carveol) AND antibacterial activity”, “(antibiofilm) and (carveol)”, “(antibiofilme) AND (carveol)”, “(antibiofilm activity) AND (carveol)”, “(atividade antibiofilme) AND (carveol)”, “(fungi) AND (carveol)”, “(fungo) AND (carveol)”, “(bacteria) AND (carveol)”, “(bactéria) AND (carveol)”, carveol* “E” antimicrobial* activity*, carveol* “E” antifungal* activity*, carveol* “E” antibacterial* activity*, carveol* “E” bacteria*, carveol* “E” fungi*, antimicrobial* activity* “E” carveol* “E” association*, antifungal* activity* “E” carveol* “E” association*, antibacterial* activity* “E” carveol* “E” association*, antimicrobial* activity* “E” carveol* “E” Checkboard method*, antifungal* activity* “E” carveol* “E” Checkboard method*, antibacterial* activity* “E” carveol* “E” Checkboard method*, antibacterial* activity* “E” carveol* “E” time kill kinetic assay*, antimicrobial* activity* “E” carveol* “E” time kill kinetic assay*, antifungal* activity* “E” carveol* “E” time kill kinetic assay*, antibiofilm activity* “E” carveol* e antibiofilm* “E” carveol*. Deste modo, para realização do método proposto, os artigos foram recuperados por um pesquisador de forma independente.

Estudos selecionados e avaliação dos procedimentos

A princípio, os títulos e resumos dos artigos encontrados, foram examinados com o intuito de averiguar os critérios de elegibilidade estabelecidos. Em seguida, ocorreu a leitura completa dos estudos selecionados na primeira etapa, os quais aqueles não qualificados, devido não atenderem o propósito do estudo, foram excluídos. Evidencia-se na figura 1, um fluxograma representando os estágios do desenvolvimento do estudo.

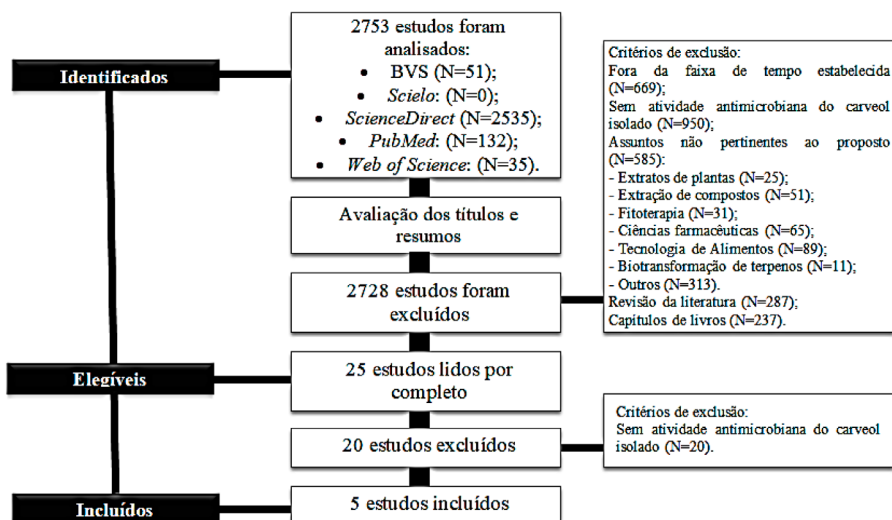


Figura 1. Processo de busca, seleção, inclusão e exclusão de artigos.

Fonte: dados coletados, 2020.

Extração de dados

Foram extraídas as seguintes variáveis: autor(es) e ano, tipo do microrganismo, espécie, identificação da cepa, inóculo, meio de cultura utilizado, método usado, concentrações de atividade, mecanismo de ação, e outras informações necessárias acerca das metodologias analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 2753 artigos recuperados nas bases de dados, apenas 5 foram selecionados para compor os resultados do estudo, sendo estes, evidenciados na tabela 1.

A atividade antimicrobiana do carveol foi verificada contra 13 (N) microrganismos presentes em distintos gêneros de bactérias (N=8) e fungos (N=5) (figura 2).

Espécies pertencentes ao gênero *Candida*, destacaram-se, devido serem os organismos mais estudados, apresentando um percentual de 30,70% (N=4), subsequentes às linhagens de *Escherichia* e *Staphylococcus*, ambas com as mesmas porcentagens, correspondentes a 23,10% (N=3).

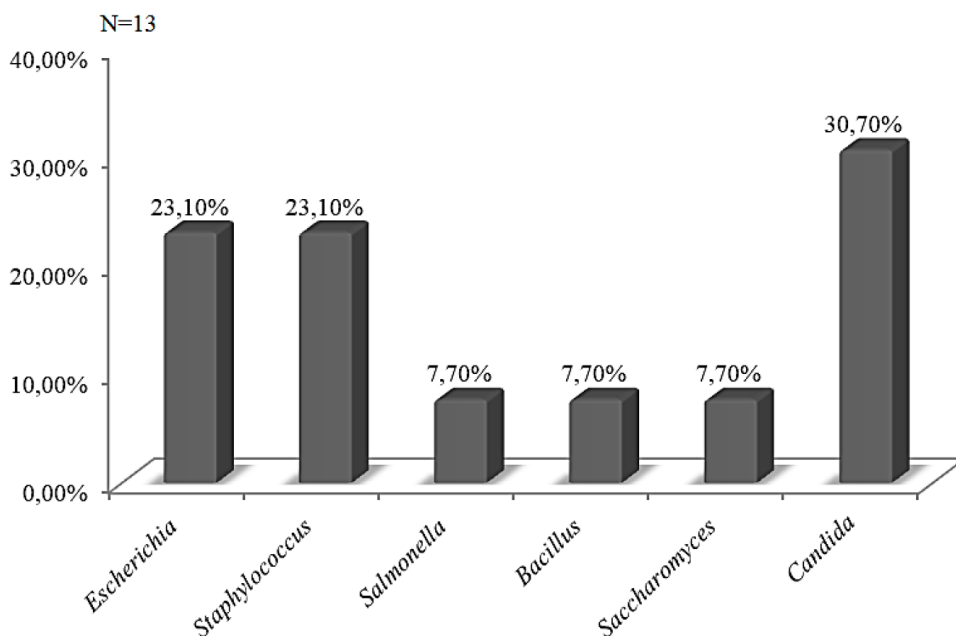


Figura 2. Percentual de cepas sensíveis ao carveol, classificadas por gênero. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do carneol.

Número	Autores (as) e ano	Tipo de microrganismo	Espécie	Identificação	Inóculo	Método	Meio de cultura	Concentração Inibitória Mínima
1	Borges <i>et al.</i> (2017) [26]	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	CECT-434*	1 × 10 ⁶ células/mL	Microdiluição	CMH**	200 µg/mL
	Borges <i>et al.</i> (2017) [26]	Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT- 976*	1 × 10 ⁶ células/mL	Microdiluição	CMH**	2000 µg/mL
2	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC-8739***	0,5 McFarland	Microdiluição	CMH**	60 µg/mL
	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-25923***	0,5 McFarland	Microdiluição	CMH**	15 µg/mL
	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	Bactéria	<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC-14028***	0,5 McFarland	Microdiluição	CMH**	30 µg/mL
	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	Bactéria	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC-14579***	0,5 McFarland	Microdiluição	CMH**	120 µg/mL
	Lopez-Romero <i>et al.</i> (2015) [27]	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	CECT-434*	1 × 10 ⁶ células/mL	Microdiluição	CMH**	200 µg/mL
3	Lopez-Romero <i>et al.</i> (2015) [27]	Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT- 976*	1 × 10 ⁶ células/mL	Microdiluição	CMH**	2000 µg/mL
	Konuk; Ergüden (2020) [28]	Fungo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPH-499	1 × 10 ⁶ CFU/mL	Disco-difusão	Caldo YPD****	10 – 20 mM
5	Montenegro <i>et al.</i> (2019) [29]	Fungo	<i>Candida glabrata</i>	10912*****	0,5 McFarland	Microdiluição	RPMI 1640	> 16 µg/mL
	Montenegro <i>et al.</i> (2019) [29]	Fungo	<i>Candida lusitanae</i>	2305*****	0,5 McFarland	Microdiluição	RPMI 1640	> 16 µg/mL
	Montenegro <i>et al.</i> (2019) [29]	Fungo	<i>Candida guilliermondii</i>	2204*****	0,5 McFarland	Microdiluição	RPMI 1640	> 16 µg/mL
	Montenegro <i>et al.</i> (2019) [29]	Fungo	<i>Candida albicans</i>	10935*****	0,5 McFarland	Microdiluição	RPMI 1640	> 16 µg/mL

*Spanish Type Culture Collection; **Caldo Muller Hinton; *** American Type Culture Collection; **** Yeast extract – Peptone – Dextrose; ***** Coleção do Laboratório de Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade de Valparaíso. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

A resistência desses micróbios aos fármacos antimicrobianos, contribuem como uma justificativa ao interesse na obtenção de novas substâncias quimioterápicas, visto que representam um problema de saúde pública, em decorrência de propiciarem ao aumento da taxa de mortalidade e morbidade. Além disso, são considerados patógenos responsáveis por ocasionar a infecções nosocomiais e oportunistas, sendo assim de grande importância clínica [30-33].

Dessa forma, para avaliação da atividade antimicrobiana do carveol é fundamental a realização de testes *in vitro*, através do uso de diversas metodologias, que podem ser visualizadas na figura 3.

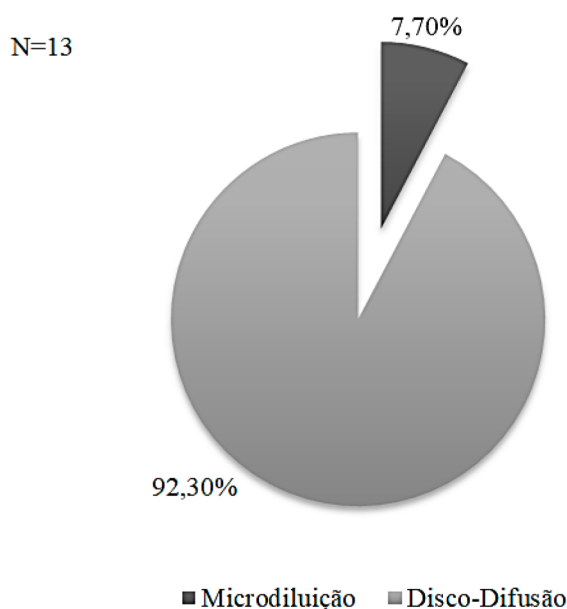


Figura 3. Técnicas de diluição e difusão (em porcentagem) utilizadas para avaliar o potencial antimicrobiano do carveol. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

A microdiluição (93, 20% / N=12) em caldo (MDC) foi o aplicado na maior parte dos artigos inclusos. O teste de MDC permite investigar o potencial bioativo de várias substâncias, empregando pequenas quantidades do composto em diferentes concentrações e dispondo de uma elevada sensibilidade e precisão [34, 35], vantagens estas, pelas quais podem ter colaborado com relação a escolha dos pesquisadores para a mencionada metodologia.

A técnica de disco-difusão foi utilizada em apenas um estudo (7, 7%), provavelmente por ser um método trabalhoso e que requer alto custo e maior espaço em laboratório para sua execução [36].

Entretanto, ambos os procedimentos são relevantes e necessários para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), em que é definida como a menor concentração do composto-teste capaz de inibir o crescimento visível do patógeno [37]. Os resultados a respeito dos valores da CIM estão expressos em percentagem na figura 4.

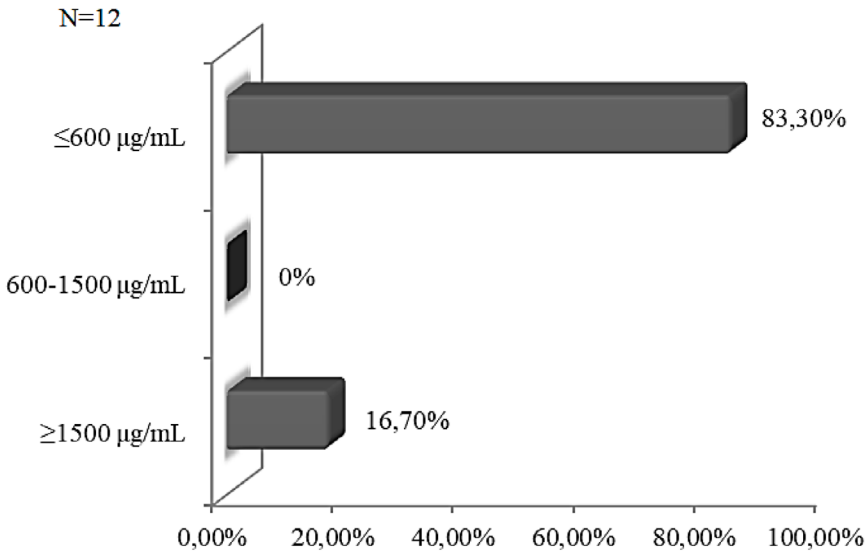


Figura 4. Valores da concentração inibitória mínima por percentagem para diferentes organismos utilizando o método de microdiluição. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

A maioria das cepas observadas nos estudos apresentaram sensibilidade ao carveol, com uma CIM correlata a valores $\leq 600 \mu\text{g/mL}$ (83,30% / N=10), seguida das concentrações $\geq 1500 \mu\text{g/mL}$ (16,70% / N=2). Portanto, o carveol apresenta atividade antimicrobiana satisfatória, tendo em vista os valores das CIM serem iguais ou inferiores a $600 \mu\text{g/mL}$ [38, 39].

Dentre os métodos pelos quais podem ser utilizados para determinação da capacidade microbicida de um produto natural ou sintético, apenas o da concentração bactericida mínima foi realizado nos trabalhos selecionados, sendo assim seus dados demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Atividade microbicida do carveol.

Número	Autores (as) e ano	Tipo de microrganismo	Espécie	Identificação	Método	Meio de cultura	Concentração microbicida mínima
1	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC-8739*	CBM **	AMH***	250 µg/mL

(Continue)

Número	Autores (as) e ano	Tipo de microrganismo	Espécie	Identificação	Método	Meio de cultura	Concentração microbicida mínima
2	Lopez-Romero <i>et al.</i> (2015) [27]	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	CECT-434****	CBM **	AMH***	1500 µg/mL
	Lopez-Romero <i>et al.</i> (2015) [27]	Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT-976****	CBM **	AMH***	2500 µg/mL

American Type Culture Collection*; **Concentração Bactericida Mínima; *Ágar Muller Hinton; *****Spanish Type Culture Collection*. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

O carveol foi efetivo a bactéria, *Escherichia coli* (ATCC-8739), com uma concentração referente a 250 µg/mL. O oposto se verificou nas cepas de *Escherichia coli* (CECT-434) e *Staphylococcus aureus* (CECT- 976), em que demonstraram concentrações de 1500 e 2500 µg/mL, respectivamente.

A CBM compreende a menor concentração do bioativo responsável por promover a morte bacteriana. Posto isto, em tratamentos destinados a enfermos imunodeficientes, é bastante proveitoso os valores desse método [40-42]. No entanto, é necessário a realização de outros experimentos utilizando modelos animais para uma elucidação melhor da atividade antimicrobiana em organismos vivos, a fim de assegurar a qualidade e segurança da terapia nesses casos.

Outros ensaios válidos são os métodos de *checkboard* e o *time-kill*. O método de *checkboard* proporciona a análise do efeito antimicrobiano originado a partir da associação entre a substância testada e um fármaco antibacteriano ou antifúngico padrão [43]. Entretanto, no acervo científico disponível não foi encontrado nenhum estudo acerca da aplicação dessa metodologia com o carveol.

A técnica de *time-kill*, por sua vez, demonstra a ação microbicida do composto testado por um período, o qual contém uma maior sensibilidade e custo [44]. Na tabela 3, pode ser verificada a cinética do carveol referente à atividade bactericida, quanto a fungicida, nenhum trabalho na literatura foi encontrado.

Tabela 3. Cinética da atividade microbicida do carveol.

Número	Autores (as) e ano	Espécie	Identificação	Inóculo	Meio de cultura	Método	Concentrações avaliadas (CIM =60 µg/mL)	Tempo (horas)	Log CFU/mL
1	Guimarães <i>et al.</i> (2019) [20]	<i>Escherichia coli</i>	ATCC-8739 ^a	5 × 10 ⁸ UFC/mL	AMH ^a	<i>Time-kill</i>	Controle	0 2 4 8 12 24	6 >6 >6 >6 >6 >6
							CIM ^{***}	0 2 4 8 12 24	6 >6 >6 >6 >6 >6
							2 x CIM ^{***}	0 2 4 8 12 24	6 6 <6 >4 0 0
							4 x CIM ^{***}	0 2 4 8 12 24	6 0 0 0 0 0

^a American Type Culture Collection; ^b Ágar Muller Hinton; ^c Concentração Inibitória Mínima. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

O carveol não ocasionou a morte de *Escherichia coli* (ATCC-8739) na CIM, entretanto foi bastante eficaz na concentração de $4 \times \text{CIM}$, o qual diminuiu o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em $6 \log_{10}$ em 2 horas, apresentando uma atividade bactericida satisfatória. É notório enfatizar também que houve a presença de uma atividade do fitoconstituente na $2 \times \text{CIM}$, reduzindo a quantidade de UFC em $6 \log_{10}$ em 12 horas.

Óleos voláteis e seus constituintes se classificam em dois grupos: substâncias de ação lenta e substâncias de ação rápida [45]. Deste modo, mediante a avaliação dos dados constatados na tabela 3, nota-se que o carveol é categorizado como um composto de ação rápida, podendo ser vantajoso seu emprego em terapias que se almejem uma morte imediata do patógeno.

Uma alternativa aplicada, atualmente, para avaliar o potencial antimicrobiano, é o ensaio equivalente à atividade antibiofilme, o qual pode ser visualizada na tabela 4.

Tabela 4. Atividade antibiofilme do geraniol.

Número	Autores (as) e ano	Espécie	Identificação	Método	Concentração do carveol	Inibição do biofilme
1	Borges <i>et al.</i> (2017) [26]	<i>Escherichia coli</i>	CECT-434*	Método de quantificação de biomassa usando cristal de violeta e unidades formadoras de colônia (570 nm)	$2 \times \text{CIM}$ **	52%
					$5 \times \text{CIM}$ **	54%
					$10 \times \text{CIM}$ **	56%
	Borges <i>et al.</i> (2017) [26]	<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT- 976*	Método de quantificação de biomassa usando cristal de violeta e unidades formadoras de colônia (570 nm)	$2 \times \text{CIM}$ **	56%
					$5 \times \text{CIM}$ **	60%
					$10 \times \text{CIM}$ **	67%

*Spanish Type Culture Collection; **Concentração inibitória mínima. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Carveol expressou uma ação antibiofilme moderada frente ao bacilo, *Escherichia coli* (CECT-434), inibindo 52%, 54% e 56% do biofilme bacteriano nas concentrações de $2 \times \text{CIM}$, $5 \times \text{CIM}$ e $10 \times \text{CIM}$, respectivamente. Quanto à atividade do terpeno frente à cepa de *Staphylococcus aureus* (CECT- 976), foi melhor, dado que apresentou percentuais de inibição maiores, sendo estes, de 52%, 60% e 67%, simultaneamente, as concentrações $2 \times \text{CIM}$, $5 \times \text{CIM}$ e $10 \times \text{CIM}$.

Tal efeito é importante, pois o biofilme caracteriza-se como um mecanismo de auto-defesa da bactéria, conseqüentemente, contribuindo para o desenvolvimento de sua resistência as drogas antibacterianas, o que contribui para uma piora no quadro clínico do indivíduo acometido [46].

A metodologia mais utilizada foi a de quantificação de biomassa usando cristal de violeta e UFC. Esta técnica é um método químico colorimétrico, pelo qual apresenta diversas vantagens, correspondentes à versatilidade, elevado rendimento e a não necessidade de serem destacados em um suporte, prevenindo uma contagem tendenciosa das colônias microbiológicas. Todavia, há limitações referentes à ausência da reprodutibilidade, falta de um protocolo padrão, além do procedimento poder estar relacionado a qualquer biomassa bacteriana aderida [47].

Ademais, o mecanismo de ação antimicrobiano do carveol, ainda é desconhecido. Contudo, estudos presentes na literatura tentam elucidá-los, permitindo-os descrever possíveis atuações, os quais podem ser analisados na tabela 5.

Após a obtenção e avaliação dos dados apresentados pelos estudos, foi evidenciado um consenso das hipóteses elaboradas pelos pesquisadores. Portanto, possivelmente o modo de ação antimicrobiano do carveol, dá-se mediante a sua capacidade de provocar danos à membrana celular do microrganismo (figura 5).

Provavelmente, o carveol, devido ao seu caráter lipofílico, atravessa a parede celular e interage com os lipídios encontrados na membrana plasmática do micróbio, tornando-as mais permeáveis (figura 5). A permeabilização da membrana citoplasmática bacteriana dá-se em razão da falta do trifosfato de adenosina (ATP), diminuição do potencial de ação, perda de íons e colapso de ATPases, como a bomba de sódio e potássio. Além disso, coagulam o citoplasma e provocam danos à parede e membrana celular, proporcionando a vazão de macromoléculas, assim como ao rompimento da célula [48, 49].

As bactérias Gram-positivas, quando comparadas as Gram-negativas, são mais vulneráveis as substâncias voláteis (como o carveol), pois são constituídas de uma camada de peptídeoglicano, embora espessa, não impossibilita a passagem desses compostos naturais; e favorecem a entrada de substâncias, através das partes hidrofóbicas dos ácidos lipoteicóicos, encontrados na membrana celular. As Gram-negativas, por sua vez, colaboram para uma limitada difusão destes produtos naturais, devido à presença de uma membrana celular externa mais complexa e resistente, sendo abundantemente formadas de lipopolissacarídeos [50].

Além dos mecanismos mencionados, nos fungos, os terpenos ainda podem promover a inibição da síntese do ergosterol. O ergosterol é um lipídeo presente na membrana plasmática destes microrganismos, sendo assim responsável pelo controle de sua fluidez e permeabilização, conseqüentemente, a perda desta estrutura lipídica contribuirá para o aumento da permeabilidade da membrana [51, 52].

Geralmente, a citotoxicidade dos óleos essenciais ocorre, sobretudo, na existência de álcoois, fenóis e aldeídos em sua composição. Logo, a radical hidroxila pertinente ao

Tabela 5. Mecanismo de ação da atividade antimicrobiana do carveol.

Número	Autores (as) e ano	Tipo de microrganismo	Espécie	Identificação	Método	Parâmetros analisados	Efeitos ao microbio	Possível mecanismo de ação
1	Guimarães <i>et al.</i> (2019)	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC-8739*	MEV**	Morfologia	Células apresentaram formas irregulares com detritos.	Interrompendo a divisão celular ou a disfunção da membrana celular.
2	Lopez-Romero <i>et al.</i> (2015)	Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	CECT-434**	Caracterização físico-química de superfícies bacterianas. Potencial Zeta Captação de iodeto de Propídio. Vazamento de potássio	Grav de hidrofbicidade, tensão superficial e componentes polares e apolares. Carga superficial Avaliação da integridade da membrana. Permeabilidade da membrana Grav de hidrofbicidade, tensão superficial e componentes polares e apolares.	A superfície celular ficou mais hidrofílica, componentes apolares não se modificaram; polares reduziram; acetador de elétrons reduziram; e o doadores de elétrons aumentaram. Células ficaram menos negativas Dano a membrana, íons adentraram na célula, corando-as em 32%. Não houve perda de potássio	Interagem fortemente com os constituintes da superfície celular, liga-se à superfície celular, formando uma monocamada ao redor da célula que modifica o potencial eletrostático e a hidrofbicidade e, portanto, desestabiliza a integridade da membrana, resultando na liberação de componentes celulares internos. Interagem fortemente com os constituintes da superfície celular, liga-se à superfície celular, formando uma monocamada ao redor da célula que modifica o potencial eletrostático e a hidrofbicidade e, portanto, desestabiliza a integridade da membrana, resultando na liberação de componentes celulares internos.
3	López-Romero <i>et al.</i> (2015)	Bactéria	<i>Saprophyococcus aureus</i>	CECT- 976**	Potencial Zeta Captação de iodeto de Propídio Vazamento de potássio	Carga superficial Avaliação da integridade da membrana Permeabilidade da Membrana	Dano a membrana, íons adentraram na célula, corando-as em 44%. Não houve perda de potássio intracelular	Perturbar a integridade da membrana celular, causando o vazamento de íons, resultando na morte celular.
	Konuk; Egişden (2020)	Fungo	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	YPH499	Medição do pH extracelular Medição da condutividade extracelular Medição da liberação do material celular	Permeabilidade da membrana Permeabilidade da membrana Avaliação da integridade da membrana	Aumentou o pH Perturbou levemente a membrana Vazamento de íons	

* American Type Culture Collection; ** Microscopia Eletrônica de Varredura; *** Spanish Type Culture Collection. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

monoterpeno estudado é fundamental a sua atividade antimicrobiana, uma vez que eleva sua lipofilicidade e é necessário para formação de ligações de hidrogênio e liberação de prótons, os quais são relevantes para acarretar a morte do patógeno [49, 53].

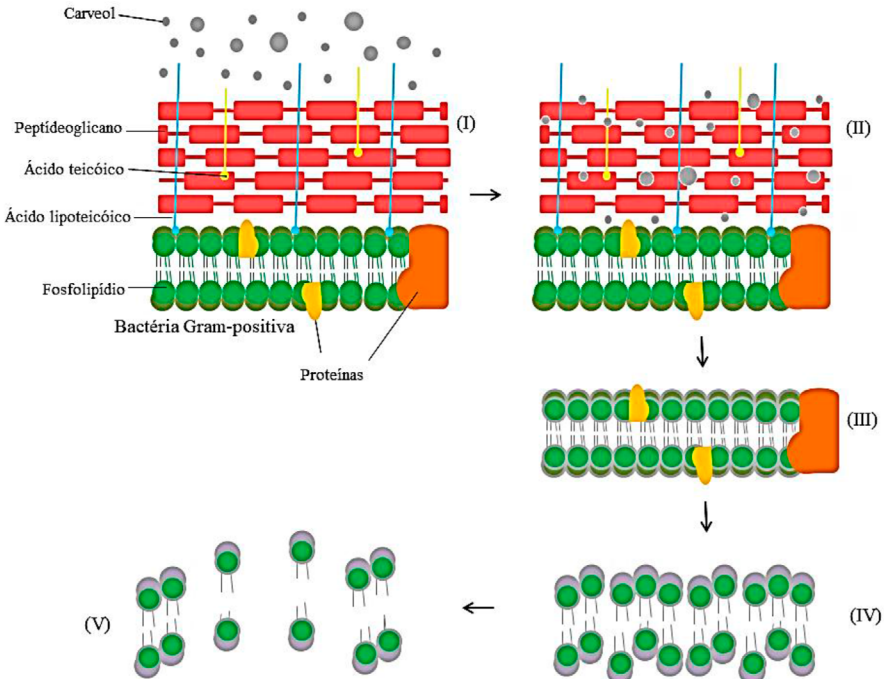


Figura 5. Representação gráfica do possível mecanismo de ação antimicrobiana do carveol. (I) O carveol interage com a superfície externa da bactéria; (II) Atravessando-a; (III) Ao chegar à membrana celular do microrganismo, mistura-se a mesma, tornando-a permeável; (IV) Em seguida, há a destruição de estruturas celulares; (V) Danos graves e irreversíveis que propiciam a ruptura da membrana celular, o que provocará a morte do micróbio. Fonte: própria autoria, 2021.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi verificada uma promissora atividade antimicrobiana do carveol, em que 13 cepas de diferentes espécies foram sensíveis ao mesmo. Além disso, *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Candida* correspondem aos gêneros mais estudados.

A técnica de microdiluição em caldo compreendeu a metodologia mais utilizada para a determinação de sua ação. Em relação à CIM, para a maioria das espécies, foram excelentes. Sobre o ensaio de *Time-kill*, o carveol possuiu ótima performance na concentração de $4 \times$ CIM, o qual evidenciou-se a redução das UFC em $6 \log_{10}$ em 2 horas.

Nenhum estudo foi encontrado na literatura acerca da utilização do método de *Chechboard*. No mais, este composto teve uma boa atividade antibiofilme à bactéria, *Staphylococcus aureus*.

Quanto ao possível mecanismo de ação da atividade antimicrobiana do carveol, dá-se mediante aos graves danos causados nas membranas citoplasmáticas, o que promoverá a lise celular. Dessa forma, poucos estudos no acervo científico disponível abordam sobre o assunto, sendo assim necessário a realização de mais estudos *in vitro* e *in vivo* para uma melhor elucidação de sua ação.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. F.M. Carneiro, M.J.P. Silva, L.L. Borges, L.C. Albernaz, J.D.P. Costa, Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil, *Rev. Sapiência*, **3**(2), 44-75 (2014).
2. P. Wangchuck, T. Tobgay, Contributions of medicinal plants to the Gross National Happiness and Biodiscovery in Bhutan, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **11**, 48 (2015).
3. M.A. Aziz, M. Adnan, A.H. Khan, A.A. Shahat, M.S. Al-Said, R. Ullah, Traditional uses of medicinal plants practiced by the indigenous communities at Mohmand Agency, FATA, Pakistan, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **14**(1), 2 (2018).
4. C.A.S.F. Miranda, M.G. Cardoso, L.R. Batista, L.M.A. Rodrigues, A.C.S. Figueiredo, Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas, *Rev. Ciênc. Agron.*, **47**(1), 213-220 (2016).
5. N.V. Busato, J.C. Silveira, A.O.S. Costa, E.F. Costa Junior, E.F. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor, *Ciênc. Rural*, **44**(9), 1574-1582 (2014).
6. R.O.M. Silva, J.W.G. Castro, O.M. Dantas Junior, A.C.J. Araújo, M.K.N.S. Leandro, R.J.O. Costa, L.L. Pinto, L.M.G. Leandro, L.E. Silva, W. Amaral, L.D. Parabocz, A.P. Ferriani, B. Garcia, B.H.L.N.S. Maia, J.E. Rocha, C.F. Bezerra, T.S. Freitas, M.S. Costa, F.F. Campina, E.F.F. Matias, M. Iriti, H.D.M. Coutinho, Photoinduced antibacterial activity of the essential oils from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. by blue led light, *Antibiotics*, **8**(4), 242 (2019).

7. E.C. Luna, I.S. Luna, L. Scotti, A.F.M. Monteiro, M.T. Scotti, R.O. Moura, R.S.A. Araújo, K.L.C. Monteiro, T.M. Aquino, F.F. Ribeiro, F.J.B.M. Medonça Junior, Active essential oils and their components in use against neglected diseases and arboviruses, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 6587150 (2019).
8. S.P. Matos, H.F. Teixeira, A.A.N. Lima, V.F. Veiga-Junior, L.S. Koester, Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review, *Biomolecules*, **9**(4), 138 (2019).
9. A.C. Huang, A. Osbourn, Plant terpenes that mediate below ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection, *Pest Manag. Sci.*, **75**(9), 2368-2377 (2019).
10. M.H.P. Lira, F.P. Andrade Júnior, G.F.Q. Moraes, G.S. Macena, F.O. Pereira, I.O. Lima, Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review, *J. Essent. Oil Res.*, **32**(3), 187-197 (2020).
11. S. Habtemariam, Antidiabetic potential of monoterpenes: a case of small molecules punching above their weight, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(1), 4 (2018).
12. E.B. Pinto, C.M.M. Neri, A.A. Oliveira Filho, N.B. Pinto, Avaliação do potencial tóxico dos monoterpenos carvacrol, linalol e p-cimeno: uma abordagem *in silico*, *Revista Interdisciplinar em Saúde*, **2**(2), 210-224 (2015).
13. G.-F. Mao, X.-C. Mo, H. Fouad, G. Abbas, J.-C. Mo, Attraction behaviour of *Anagrus nilaparvatae* to remote lemongrass (*Cymbopogon distans*) oil and its volatile compounds, *Nat. Prod. Res.*, **32**(5), 514-520 (2017).
14. A.C. Cardoso-Teixeira, F.W. Ferreira-da-Silva, D. Peixoto-Neves, K. Oliveira-Abreu, A. Pereira-Gonçalves, A.N. Coelho-de-Souza, J.H. Leal-Cardoso, Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats, *Molecules*, **26**(6), 1430 (2018).
15. B. Mahdavi, W.A. Yaacob, L.B. Din, Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of essential oils from *Etilingera sayapensis* A.D. Poulsen & Ibrahim, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **10**(8), 819-826 (2017).
16. A.I. Hussain, F. Anwar, M. Shahid, M. Ashraf, R. Przybylski, Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan, *J. Essent. Oil Res.*, **22**(1), 78-84 (2010).

17. N. Kaur, K.K. Chahal, A. Kumar, R. Singh, U. Bhardwaj, Antioxidant activity of *Anethum graveolens* L. essential oil constituents and their chemical analogues, *J. Food Biochem.*, **43**(4), e12782 (2019).
18. R.E.R. Silva, A.A. Silva, L. Pereira-de-Morais, N.S. Almeida, M. Iriti, M.R. Kerntopf, I.R.A. Menezes, H.D.M. Coutinho, R. Barbosa, Relaxant effect of monoterpene (-)-carveol on isolated human umbilical cord arteries and the involvement of ion channels, *Molecules*, **25**(11), 2681 (2020).
19. Y. Lozon, A. Sultan, S.J. Lansdell, T. Prytkova, B. Sadek, K.-H.S. Yang, F.C. Howarth, N.S. Millar, M. Oz, Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol, *Eur. J. Pharmacol.*, **5**, 44-51 (2016).
20. A.C. Guimarães, L.M. Meireles, M.F. Lemos, M. Guimarães, D.C. Endringer, M. Fronza, R. Scherer, Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils, *Molecules*, **24**(13), 2471 (2019).
21. F.M. Marques, M.M. Figueira, E.F.P. Schmitt, T.P. Kondratyuk, D.C. Endringer, R. Scherer, M. Fronza, *In vitro* anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway, *Inflammopharmacology*, **27**(2), 281-289 (2019).
22. S. Echeverrigaray, J. Zacaria, B. Beltrão, Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *meloidogyne incognita*, *Phytopathology*, **100**(2), 199-203 (2010).
23. M. Bordoloi, S. Saikia, B. Kolita, R. Sarmah, S. Roy, B. Narzary, Volatile inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway: anticancer potential of aroma compounds of plant essential oils, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **18**(1), 87-109 (2018).
24. J.C.R. Gonçalves, A.M.H. Alves, A.E.V. Araújo, J.S. Cruz, D.A.M. Araújo, Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **645**(1-3), 108-112 (2010).
25. C.B.B. Oliveira, M.C. Ribeiro, A.D'a Lima, M.F. Faria, G.M. Ravanholi, L.M. Lopes, K.M.J. Souza, A.A. Monroe, Experiências de adoecimento por condições crônicas transmissíveis: revisão integrativa da literatura, *Saude Soc.*, **26**(2), 510-520 (2017).
26. A. Borges, J.C. Lopez-Romero, D. Oliveira, E. Giaouris, M. Simões, Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils, *J. Appl. Microbiol.*, **123**, 104-105 (2017).

27. J.C. Lopez-Romero, H. González-Ríos, A. Borges, M. Simões, Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **2015**, 795435 (2015).
28. H.B. Konuk, B. Ergüden, Phenolic –OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity, *Folia Microbiol. (Praha)*, **65**(4), 775-783 (2020).
29. I. Montenegro, M. Mellado, A. Russo, B. Said, X. Besoain, P. Godoy, E. Werner, N. Caro, A. Madrid, Carveoylphenols and their antifungal potential against pathogenic yeasts, *Antibiotics (Basel)*, **8**(4), 185 (2019).
30. E.B. Nunes, N.B. Nunes, J.C.M.S. Monteiro, A.L.V. Paes, Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil, *Rev. Pan-American. Saúde*, **2**(4), 23-30 (2011).
31. L.L. Kadosaki, S.F. Souza, J.C.M. Borge, Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar, *Rev. Bras. Farm.*, **93**(2), 128-135 (2012).
32. L. Cordeiro, P. Figueiredo, H. Souza, A. Sousa, F. Andrade-Júnior, J. Barbosa-Filho, E. Lima, Antibacterial and antibiofilm activity of myrtenol against *Staphylococcus aureus*, *Pharmaceuticals*, **13**(6), 133 (2020).
33. F. He, W. Wanga, M. Wua, Y. Fanga, S. Wanga, Y. Yang, C. Yed, F. Xiang, Antioxidant and antibacterial activities of essential oil from *Atractylodes lancea* rhizomes, *Ind. Crop. Prod.*, **153**, 112552 (2020).
34. C.M. de-Souza-Silva, F. Guilhelmelli, D. Zamith-Miranda, M.A. Oliveira, J.D. Nosanchuk, I. Silva-Pereira, P. Albuquerque, Broth microdilution *in vitro* screening: an easy and fast method to detect new antifungal compounds, *J. Vis. Exp.*, **132**, 57127 (2018).
35. A. Veiga, M.G.T. Toledo, L.S. Rossa, M. Mengarda, N.C.F. Stofella, L.J. Oliveira, A.G. Gonçalves, F.S. Murakami, Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds, *J. Microbiol. Methods*, **162**, 50-31 (2019).
36. E.A.M. Bona, F.G.S. Pinto, T.K. Fruet, T.C.M. Jorge, A.C. Moura, Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos, *Arq. Inst. Biol.*, **81**(3), 218-225 (2014).

37. M.S.A. Silva, M.A.R. Silva, J.S. Higino, M.S.V. Pereira, A.A.T. Carvalho, Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas, *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**(2), 236-240 (2008).
38. R. Scherer, R. Wagner, M.C.T. Duarte, H.T. Godoy, Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa, *Rev. Bras. Plantas Med.*, **11**(4), 442-449 (2009).
39. A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G. M. Figueira, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, **35**, 275-280 (2004).
40. I.B. Suffredini, A.D. Varella, R.N. Younes, Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras, *J. Health Sci. Inst.*, **25**(2), 127-129 (2007).
41. T.B. Dantas, *Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero Penicillium*, dissertação, Universidade Federal da Paraíba, 2013, p. 1-100.
42. E. Bancalari, F. Martelli, V. Bernini, E. Neviani, M. Gatti, Bacteriostatic or bactericidal? Impedometric measurements to test the antimicrobial activity of *Arthrospira platensis* extract, *Food Control*, **118**, 107380 (2020).
43. G. Mitchell, M. Lafrance, S. Boulanger, D.L. Séquin, I. Guay, M. Gattuso, E. Marsault, K. Bouarab, F. Malouin, Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression, *J. Antimicrob. Chemother.*, **67**(3), 559-568 (2012).
44. M.R. Rosatto, *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda*, dissertação, Universidade Estadual Paulista, 2012, p. 1-101.
45. M. Friendman, P.R. Henika, C.E. Levin, R.E. Mandrell, Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice, *J. Agric. Food Chem.*, **52**(19), 6042-6048 (2004).
46. T.T. Nader, J.S. Coppede, S.H. Taleb-Contini, L.A. Amaral, A.M. Pereira, Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina, *Pesq. Vet. Bras.*, **38**(9), 1713-1719 (2018).

47. J. Azeredo, N.F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A.R. Costa, M. Desvaux, G.D. Bonaventura, M. Hébraus, Z. Jaglic, M. Kačániová, S. Knöchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R.L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse, C. Sternberg, Critical review on biofilm methods, *Crit. Rev. Microbiol.*, **43**(3), 313-351 (2017).
48. H.D.M. Coutinho, M.A. Freitas, C.N.F.L. Gondim, R.S. Albuquerque, J.V.A. Ferreira, J.C. Andrade, *In vitro* antimicrobial activity of geraniol and caryophyllene against *Staphylococcus aureus*, *Rev. Cubana Plant. Med.*, **20**(1), 98-105 (2015).
49. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 446-475 (2008).
50. S. Chouhan, K. Sharma, S. Guleria, Antimicrobial activity of some essential oils –present status and future perspectives, *Medicines*, **4**(3), 58 (2017).
51. A. Luchini, R. Delhom, V. Cristiglio, W. Knecht, H. Wacklin-Knecht, G. Fragneto, Effect of ergosterol on the interlamellar spacing of deuterated yeast phospholipid multilayers, *Chem. Phys. Lipids*, **227**, 104873 (2020).
52. R.S.N. Brilhante, E.P. Caetano, R.A.C. Lima, F.J.F. Marques, D.S.C.M. Castelo-Branco, C.V.S. Melo, G.M.M. Guedes, J.S. Oliveira, Z.P. Camargo, J.L.B. Moreira, A.J. Monteiro, T.J.P.G. Bandeira, R.A. Cordeiro, M.F.G. Rocha, J.J.C. Sidrim, Terpinen-4-ol, tyrosol, and -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi, *Braz. J. Microbiol.*, **47**, 917-924 (2016).
53. K. Wang, S. Jiang, T. Pu, L. Fan, F. Su, M. Ye, Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi, *Nat. Prod. Res.*, **33**(10), 1423-1430 (2018).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

G.F. Queiroga-Moraes, G.M. Santos, F.M. de Araújo-Castro, I. Oliveira-Lima, O potencial antimicrobiano do carveol: uma revisão integrativa, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 851-871 (2021).

REV. COLOMB. CIENC. QUÍM. FARM.,
VOL. 50, NÚMEROS 1 A 3, 2021.

ÍNDICE GENERAL POR TIPO DE ARTÍCULOS

Artículos de investigación científica

- Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves
Maisa Sayuri Nagano, Claudemir Batalini 29
- Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
Paulo Roberto Barros Gomes, Gilson Vitorino de Assunção, Gustavo Oliveira Everton, Helson Souza de Lima, Jorge Ricardo Fernandes de Araújo, Eduardo Fonseca Silva, Andréa Vasconcelo Melo, Hilton Costa Louzeiro, Jonas Batista Reis, Victor Elias Mouchrek Filho 48
- Luliconazole: Stability-indicating LC method, structural elucidation of major degradation product by HRMS and *in silico* studies
Douglas dos Santos Porto, Lisiane Bajerski, Marcelo Donadel Malesuik, Juliano Braun Azeredo, Fávero Reisdorfer Paula, Clésio Soldateli Paim 61
- Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier
Margarita Báez, Esther Inés Torres, Ana Elena Gruszycki, Daniel Andrés Alba, Gabriela Malena Valenzuela, Mabel Rosalía Gruszycki 86
- A descrição matemática da detecção eletroquímica da ergina, assistida pelos novos derivados triazólicos, dopados pelo íon amavadina
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Sílvio C. de Oliveira, Volodymyr V. Parchenko, Vira M. Odyntsova, Ilona I. Aksyonova, Yana G. Ivanushko, Petro I. Yagodynets', Zholt O. Kormosh 174

- Descripción matemática de la determinación electroanalítica del fármaco salvarsano y su ciclooligómeros, asistida por un compuesto del colorante escuárico y oxihidróxido de cobalto
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvia C. De Oliveira, Lucinda Vaz dos Reis, Petro I. Yagodynets'1, Zholt O. Kormosh 205
- Hydrazones derived from natural aldehydes: *in vitro* cytotoxic evaluation and *in silico* pharmacokinetic predictions
Victória Laysna dos Anjos Santos, Arlan de Assis Gonsalves, Maria Franciele Souza Silva, Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira, Marcília Pinheiro da Costa, Claudia O. Pessoa, Cleônia R. M. Araújo 217
- Actividad antioxidante de cuatros especies vegetales del nordeste argentino
Ariadna Soledad Soro, Gabriela Malena Valenzuela, María Beatriz Núñez.....236
- Prediction of sulfamerazine and sulfamethazine solubility in some cosolvent mixtures using non-ideal solution models
Luz Elena Tinoco, Diana M. Galindres, Jhonny Osorio, Rossember E. Cárdenas 292
- Síntesis en fase sólida de un neuropéptido cosmeceútico y su microencapsulación en un sistema liposomal
J. Andrés Sandoval A., Jaiver E. Rosas P 439
- Synthesis and antileishmanial activity of naphthoquinone-based hybrids
Délis Galvão Guimarães, Sidney Silva Simplício, Valéria Carlos de Sousa, Klingler 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
- 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

Spray dried extract of *Calophyllum brasiliense* Cambés produces a potent hypoglycemic effect and improves total serum cholesterol and triglycerides in diabetic rats.

Jesús Rafael Rodríguez Amado, Ariadna Lafourcade Prada,
Bianca Rodrigues Acacio, Veronica Bautista Robles, Hady Keita,
Tatiane Pereira de Souza xx-1

Hypoglycemic and Antihyperlipidemic effects of *Syzygium cumini* (Lamarck) Skeels and *Syzygium paniculatum* Gaertn.

Renata Junqueira Pereira, Maria das Graças Cardoso, Milene Aparecida Andrade,
Rodrigo Junqueira Pereira xx-4

Coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) act against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*

Laís Vilar Cordeiro, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Giulian César da Silva Sá,
Aleson Pereira Sousa, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo,
Maria das Neves Silva Neta, José Maria Barbosa Filho,
Edeltrudes de Oliveira Lima xx-6

In silico and *in vitro* analysis of a new potential antifungal substance, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, against invasive candidiasis isolates

Romulo Pereira de Moura Sousa, Daniele de Figuerêdo Silva,
Neuza Maria Cavalcante Oliveira, Zélia Braz Vieira Da Silva Pontes,
Hermes Diniz Neto, Laís Vilar Cordeiro, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo,
Rafael Farias de Oliveira, Helivaldo Diógenes da Silva Souza,
Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, Edeltrudes de Oliveira Lima xx-7

Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases among ampicillin-resistant Enterobacteriales recovered from a municipal raw sewage in Minas Gerais, Brazil

Niuane Thais Alves Coelho, Raquel Salviano da Silva, Giovana Morais Delmondes,
William Gustavo Lima, Carlos Eduardo de Matos Jensen, Magna Cristina de Paiva xx-8

Metabolitos bioactivos y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial extraído de dos especies del género *Tagetes*

Rosa Huaraca Aparco, María del Carmen Delgado Laime, Fidelia Tapia Tadeo xx-9

Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

John Alexander Torres Lemus, Ángela Patricia Rojas Rojas, Fabián Lopez-Vallejo xx-10

A descrição teórica da detecção eletroquímica do fármaco olanzapina, assistida pelo composto do oxihidróxido de cobalto (III) com um corante esquarínico

Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Yana G. Ivanushko, Sílvio C. De Oliveira, Lucinda Vaz dos Reis, Petro I. Yagodynets', Zholt O. Kormosh, Olga V. Luganska, Vira V. Kopiika, Natalia V. Novosad, Adriano O. da Silva

xx-11

Extended Hildebrand solubility approach and Yalkowsky-Roseman model for estimating the solubility of sulfadiazine and sulfamethazine in some {ethylene glycol (1) + water (2)} mixtures at several temperatures

Martha Sofia Vargas-Santana, Ana María Cruz-González, Nestor Enrique Cerquera, Alana Sofia Escobar Rodriguez, Rossember E. Cardenas, Omar Calderón-Losada, Claudia Patricia Ortiz, Daniel Ricardo Delgado

xx-14

Artículos de investigación tecnológica

Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico

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

158

Caracterização físico-química, fitoquímica e avaliação da eficácia antimicrobiana de um gargarejo fitoterápico

Laura Christina Freitas, Ana Laura de Cabral Sobreira, Francisco Patricio de Andrade Júnior, Egberto Santos Carmo, Júlia Beatriz Pereira de Souza

253

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

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

- Official labeled and unlabeled Brazilian honey. Comparison between physicochemical, microbiological, and microscopic parameters
Gabriel S. Silva, Vinicius Bernardoni, Rânia M. Santana, Paula S.S.T. Calaça, Débora S. Assis, William G. Lima, Lívia C.P. Gardoni, Júlio C.M. Brito 457
- 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
- Fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y cuantificación de flavonoides del zumo de *Citrus x clementina* (naranja)
César Joe Valenzuela Huamán, Lida Velazque Rojas, Carolay Julissa Cordova Villavicencio, Tania de la Flor Cutimpo Paucar xx-5
- Artículos de investigación clínica**
- Estudio descriptivo transversal de los grupos terapéuticos más prescritos en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México
Veronica Castro Bear, Francisco L. Balderas Gómez, Oscar Zuñiga Lemus 184
- 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
- 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 Montaña Avila, José Julián López Gutiérrez 386
- Polimedición, 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

Método LAMP como alternativa diagnóstica para la detección del virus SARS-CoV-2

María Elizabeth Méndez Tibambre, Zully Johana Rodríguez Parra,
Diana Daniela Portela Dussan, María Fernanda Bustamante Restrepo,
Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez

xx-2

Associação entre o consumo de café e de medicamentos psicoativos e a qualidade do sono de estudantes universitários

Karina Petean Grassi, Rafaela Sirtoli, Renne Rodrigues, Daniela Frizon Alfieri,
Camilo Molino Guidoni, Giovana Frazon de Andrade, Edmarlon Giroto

xx-12

Histomorphometric analysis in HPV-induced cervical lesions

Emanuelly Bernardes-Oliveira, Kleyton Thiago Costa de Carvalho,
Ricardo Ney Oliveira Cobucci, Ana Katherine Gonçalves, Deysse de Souza Dantas,
Janaína Cristiana de Oliveira Crispim

xx-15

Artículos de revisión

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

Gustavo Fernandes Queiroga Moraes, Laísa Vilar Cordeiro,
Francisco Patricio de Andrade Júnior

5

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

Cláudio Daniel Cerdeira, Matheus Pereira de Araújo,
Carla Beneditini Ribeiro Jorge Ferreira, Amanda Latercia Tranches Dias,
Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

100

Food nitrates and nitrites as possible causes of cancer: A review

Francisco Patricio de Andrade Júnior, Ana Laura Sobreira de Cabral,
Januse Millia Dantas de Araújo, Laísa Vilar Cordeiro, Marília de Barros Cândido,
Alison Pontes da Silva, Brenda Tamires de Medeiros Lima, Bruna Braga Dantas

269

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

Xiomara Alejandra Cabrera Martínez, Luis Enrique Cuca Suarez

352

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

Silvia Enríquez-Fernández

476

Estudo prospectivo tecnológico e científico de antissépticos para prevenir a disseminação de SARS-COV-2 e outros vírus patogênicos

Robson Almeida Silva, Fabiany Cruz Gonzaga, Gisele Moraes de Jesus

xx-3

Sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros:
Revisión narrativa

María C. García-Cabrera, Olga T. Guerron-Morales, Juan M. Astaiza-Martínez,
Carmenza J. Benavides-Melo

xx-13

O potencial antimicrobiano do carveol: uma revisão integrativa

Gustavo Fernandes Queiroga Moraes, Girlene Macena Santos,
Franciele Maiara de Araújo Castro, Igara Oliveira Lima

xx-16

ÍNDICE GENERAL DE AUTORES

Aksyonova, I.I.,	174	Cavalcante-Oliveira, N.M.,	xx-7
Alba, D.A.,	86	Cerdeira, C.D.,	100
Alfaro-Mora, R.,	423	Cerquera, N.E.,	xx-14
Almeida-Silva, R.,	xx-3	Cordova-Villavicencio, C.J.,	xx-5
Alves-Coelho, N.T.,	xx-8	Costa de Carvalho, K.T.	xx-15
Alves-Silva, C.,	533	Costa-Louzeiro, H.,	48
Andrade, M.A.,	xx-4	Cruz-Gonzaga, F.,	xx-3
Araújo, C.R.M.,	217, 505	Cruz-González, A.M.,	xx-14
Aristizábal-Gutiérrez, F.A.,	xx-2	Cuca-Suarez, L.E.,	352
Assis, D.S.,	457	Cutimpo-Paucar T.d.l.F.,	xx-5
Astaiza-Martínez, J.M.,	xx-13	da Franca-Rodrigues, K.A.,	505
Báez, M.,	86	da Silva, A.O.,	xx-11
Bajerski, L.,	61	da Silva-Pontes, Z.B.V.,	xx-7
Balderas-Gómez, F.L.,	184	da Silva-Sá, G.C.,	xx-6
Barberis, E.,	522	da Silva-Souza, H.D.,	xx-6, xx-7
Barbosa dos Santos, K.,	533	Dantas de Araújo, J.M.,	269
Barbosa Filho, J.M.,	xx-6	de Andrade Jr., F.P.,	5, 253, 269
Baró-Rodríguez, L.,	339	de Araújo-Castro, F.M.,	xx-16
Barros-Gomes, P.R.,	48	de Assis-Gonsalves, A.,	217, 550
Batalini, C.,	29	de Assunção, G.V.,	48
Batista-Reis, J.,	48	de Athayde Filho, P.F.,	xx-7
Bautista-Robles, V.,	xx-1	de Barros-Cândido, M.,	269
Beldarraín, M.B.,	522	de Cabral-Sobreira, A.L.,	253
Benavides-Melo, C.J.,	xx-13	de Figuerêdo-Silva, D.,	xx-7
Benedini, C.,	100	de Matos-Jensen, C.E.,	xx-8
Bernardes-Oliveira, E.	xx-15	de Medeiros-Lima, B.T.,	269
Bernardoni, V.,	457	de Moura-Sousa, R.P.,	xx-7
Braga-Dantas, B.,	269	de Oliveira, S.C.,	174, 205, xx-11
Braun-Azereido, J.,	61	de Oliveira-Centurião, P.,	158
Brito, J.C.M.,	457	de Oliveira-Crispim, J.C.	xx-15
Burguet-Lago, N.,	339	de Oliveira-Lima, E.,	xx-6, xx-7
Bustamante-Restrepo, M.F.,	xx-2	de Paiva, M.C.,	xx-8
Cabrera-Martínez, X.A.,	352	de Siqueira, F.,	533
Calaça, P.S.S.T.,	457	de Souza-Dantas, D.	xx-15
Calderón-Losada, O.,	xx-14	Delgado, D.R.,	xx-14
Cárdenas, R.E.,	292, xx-14	Delgado-Laime, M.d.C.,	xx-9
Cardoso, M.d.G.,	xx-4	Donizeti-Damasceno, A.,	533
Carlos de Sousa, V.,	505	dos Anjos-Santos, V.L.,	217
Carneiro, S.M.P.,	505	dos Santos-Farias, W.K.,	571
Carvalho, F.A.A.,	505	dos Santos-Porto, D.,	61
Castro-Bear, V.,	184	dos Santos-Souza, L.,	571

Dudik, N.H.,	406	Melo-Araújo, C.R.,	550
Enríquez-Fernández, S.,	476	Méndez-Tibambre, M.E.,	xx-2
Erceg, Y.P.D.,	406	Mohamad-Kassab, N.,	158
Escobar-Rodríguez, A.S.,	xx-14	Molino-Guidoni, C.,	xx-12
Espinosa dos Santos, P.,	158	Montaño-Ávila, M.P.,	386
Evangelista de Oliveira, F.d.C.,	217	Moraes de Jesus, G.,	xx-3
Fajreldines, A.V.,	522	Morais-Delmondes, G.,	xx-8
Farias de Oliveira, R.,	xx-7	Mouchrek Filho, V.E.,	48
Fernandes de Araújo, J.R.,	48	Muñoz-Bejarano, M.J.,	423
Ferreira, R.J.,	100	Neto, H.D.,	xx-7
Ferreira-Lopes, A.,	533	Novosad, N.V.,	xx-11
Fonseca, D.,	571	Núñez, M.B.,	236, 406
Fonseca-Silva, E.,	48	Odyntsova, V.M.,	174
Frazon de Andrade, G.,	xx-12	Oliveira da Silva, G.A.,	550
Freitas, L.C.,	253	Oliveira-Cobucci, R.N.	xx-15
Frizon-Alfieri, D.,	xx-12	Oliveira-Everton, G.,	48, 571
Galindres, D.M.,	292	Oliveira-Lima, I.,	xx-16
Galvão-Guimarães, D.,	505	Ortiz, C.P.,	xx-14
García-Cabrera, M.C.,	xx-13	Osorio, J.,	292
Gardoni, L.C.P.,	457	Parchenko, V.V.,	174
Giroto, E.,	xx-12	Pellizzari, M.,	522
Gonçalves, A.K.	xx-15	Pereira de Araújo, M.,	100
Gonsalves, A.d.A.,	505	Pereira de Araújo-Neto, A.,	571
Gruszycki, A.E.,	86	Pereira de Sousa, I.T.,	571
Gruszycki, M.R.,	86	Pereira de Souza, J.B.,	253
Guerron-Morales, O.T.,	xx-13	Pereira de Souza, T.,	xx-1
Herman, C.,	406	Pereira-Sousa, A.,	xx-6
Huaraca-Aparco, R.,	xx-9	Pessoa, C.O.,	217
Ivanushko, Y.G.,	174, 205, xx-11	Petean-Grassi, K.,	xx-12
Junqueira-Pereira, R.,	xx-4	Pinheiro da Costa, M.,	217, 505
Keita, H.,	xx-1	Polanco-Leal, S.A.,	325
Kopiika, V.V.,	xx-11	Pontes da Silva, A.,	269
Kormosh, Z.O.,	174, 205, xx-11	Portela-Dussan, D.D.,	xx-2
Kushnir, M.V.,	174, 205, xx-11	Queiroga-Moraes, G.F.,	5, xx-16
Lafourcade-Prada, A.,	xx-1	Quiroga-Robayo, L.D.,	386
Lima, W.G.,	457, xx-8	Ramalho de Figueiredo, P.T.,	xx-6, xx-7
Lima-Brigagão, M.R.P.,	100	Reisdorfer-Paula, F.,	61
López-Gutiérrez, J.J.,	386	Rivera-Gutiérrez, I.Z.,	325
López-Vallejo, F.,	xx-10	Rodrigues, R.,	xx-12
Luganska, O.V.,	xx-11	Rodrigues-Acacio, B.,	xx-1
Macena-Santos, G.,	xx-16	Rodrigues-Martins, M.,	533
Malesuik, M.D.,	61	Rodriguez, V.,	522
Marques-Rosa, A.,	158	Rodriguez-Amado, J.R.,	xx-1
Martínez-Betancourt, M.V.,	339	Rodriguez-Parra, Z.J.,	xx-2
Martínez-Carmona, D.M.,	490	Rojas-Rojas, Á.P.,	xx-10

Rosas P., J.E.,	439	Souza-Silva, M.F.,	217
Ruiz-Rodríguez, Y.,	423	Tapia-Tadeo, F.,	xx-9
Sáenz-García, G.,	423	Tinoco, L.E.,	292
Sáez, G.A.,	406	Tkach, V.V.,	174, 205, xx-11
Salamanca-Ramos, E.,	325	Tobón-Zapata, G.E.,	490
Salviano da Silva, R.,	xx-8	Toledo-Carrabeo, G.,	339
Sandoval A., J.A.,	439	Torres, E.I.,	86
Santana, R.M.,	457	Torres-Lemus, J.A.,	xx-10
Santos da Silva, I.,	571	Tranches-Dias, A.L.,	100
Santos-Carmo, E.,	253	Troche-Concepción, Y.,	339
Santos-Júnior, P.S.,	571	Valenzuela, G.M.,	86, 236
Sayuri-Nagano, M.,	29	Valenzuela-Huamán, C.J.,	xx-5
Serra-Rosa, P.V.,	571	Valerio, M.A.,	522
Silva, G.S.,	457	Vargas-Santana, M.S.,	xx-14
Silva-Neta, M.d.N.,	xx-6	Vasconcelo-Melo, A.,	48
Silva-Simplicio, S.,	505	Vaz dos Reis, L.,	205, xx-11
Sirtoli, R.,	xx-12	Velasco-Páez, Z.,	325
Sobreira de Cabral, A.L.,	269	Velazque-Rojas, L.,	xx-5
Soldateli-Paim, C.,	61	Vilar-Cordeiro, L.,	5, 269, xx-6, xx-7
Soria, E.M.,	406	Yagodynets', P.I.,	174, 205, xx-11
Soro, A.S.,	236	Zuñiga-Lemus, O.,	184
Souza de Lima, H.,	48		

ÍNDICE ANALÍTICO DE TÉRMINOS

Español			
Microbiología,	6	Sensor electroquímico,	205
<i>Staphylococcus</i> ,	6	Oxihidróxido de cobalto,	205
Técnicas de laboratorio clínico,	6	Colorante escuárico,	205
Fitoquímica,	31	Oscilaciones electroquímicas,	205
Actividad antioxidante,	31	Estado estacionario estable,	205
Toxicidad,	31	Fármacos antineoplásicos,	218
Planta medicinal,	31	Cáncer,	218
<i>Aedes aegypti</i> ,	49	Hibridación molecular,	218
Larvas,	49	Fenilhidrazonas,	218
Compuestos volátiles,	49	Radicales libres,	236
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck,	49	Polifenoles,	236
Aceite destilado,	49	<i>Euphorbiaceae</i> ,	236
Luliconazol,	62	<i>Phyllanthaceae</i> ,	236
Método indicativo de la estabilidad,	62	Fitoterapia,	255
Degradación forzada,	62	Control de calidad,	255
Producto de degradación,	62	Faringoamigdalitis,	255
Estudios <i>in silico</i> ,	62	Conservantes,	270
Zeneth® <i>software</i> ,	62	Carcinogénesis,	270
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> ,	86	Nitratos,	270
polifenoles,	86	Nitritos,	270
Antioxidantes,	86	Sulfametazina,	293
Antiinflamatorios,	86	Sulfamerazina,	293
Estrés oxidativo,	102	Solubilidad,	293
Estrés nitrosativo,	102	Modelo de van't Hoff,	293
Hongos,	102	Modelo de Apelblat modificado,	293
<i>Candida albicans</i> ,	102	Modelo de Buchowski-Ksiazczak λb ,	293
Antifúngico,	102	Modelo de van't Hoff-Yaws,	293
Productos naturales,	102	Modelo de Weibull de dos parámetros,	293
Ácido glicólico,	160	Adherencia al tratamiento,	325
Productos cosméticos,	160	Adulto mayor,	325
Control de calidad,	160	Medicamento,	325
Ergina,	175	Succinilcolina,	339
Sensor electroquímico,	175	Inyectable,	339
Triazoles,	175	Desarrollo,	339
Amavadina,	175	Myristicaceae,	352
Polímeros conductores,	175	Actividad enzimática,	352
Estado estacionario estable,	175	Compuestos fenólicos,	352
Recetas,	185	Inmunoglobulina humana inespecífica intravenosa (IGIV),	387
Grupos terapéuticos,	185	Utilización de medicamentos,	387
Polifarmacia,	185	Uso fuera de lo indicado,	387
Salvarsano,	205	Complejo termal,	406
		Composición fisicoquímica,	406

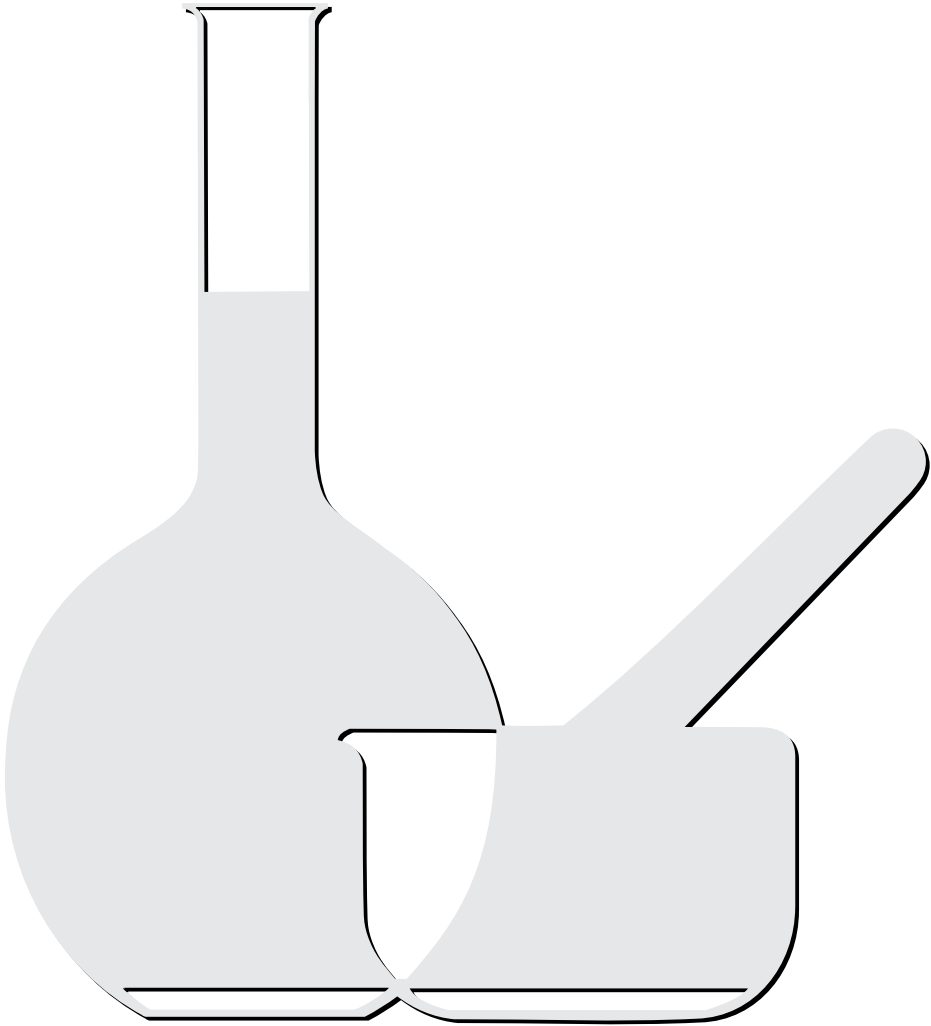
Análisis microbiológico,	406	Isoniazida,	506
Acción terapéutica,	406	Hidrazona,	506
Disposición final,	424	Polimedicación,	523
Utilización de medicamentos,	424	Ancianos hospitalizados,	523
Residuos,	424	Prescripción inapropiada,	523
Reciclaje,	424	Eventos adversos a fármacos,	523
Almacenaje de medicamentos,	424	Atención farmacéutica,	534
Péptidos sintéticos,	439	Farmacia veterinaria,	534
Liposomas,	439	Prescripción,	534
Microencapsulación,	439	Veterinaria,	534
Análisis fisicoquímico,	458	Farmacia hospitalaria,	534
Análisis microbiológico,	458	Seguridad del paciente,	534
Miel,	458	Nimesulida,	551
Polen,	458	Biopolímero,	551
Medicamentos,	476	Reticulación,	551
Internet,	476	Cinética de liberación,	551
Medicamentos falsificados,	476	Aceite esencial,	572
Coronavirus,	476	<i>Alpinia zerumbet</i> ,	572
Compuesto de coordinación,	490	<i>Cymbopogon citratus</i> ,	572
Crema,	490	Jacareúba,	xx-1
Crema-gel,	490	Diabetes,	xx-1
Extensibilidad,	490	Secado,	xx-1
β -lapachone,	506	Optimización,	xx-1
α -lapachone,	506	Diseño d-óptimo,	xx-1
Hibridación molecular,	506	<i>Calophyllum brasiliense</i> ,	xx-1
Hidralazina,	506		

Inglés		
Microbiology,	5	Electrochemical sensor,
<i>Staphylococcus</i> ,	5	Cobalt oxyhydroxide,
Clinical laboratory techniques,	5	Squaraine dye,
Phytochemistry,	29	Electrochemical oscillations,
Antioxidant activity,	29	Stable steady-state,
Toxicity,	29	Antineoplastic drugs,
Medicinal plant,	29	Cancer,
<i>Aedes aegypti</i> ,	48	Molecular hybridization,
Larvae,	48	Phenylhydrazones,
Volatile compounds,	48	Free radicals,
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck,	48	Polyphenols,
Distilled oil,	48	<i>Euphorbiaceae</i> ,
Luliconazole,	62	<i>Phyllanthaceae</i> ,
Stability-indicating method,	62	Phytotherapy,
Forced degradation,	62	Quality control,
Degradation product,	62	pharyngotonsillitis,
<i>In silico</i> study,	62	Preservative,
Zeneth® software,	62	Carcinogenesis,
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> ,	87	Nitrate,
Polyphenols,	87	Nitrite,
Antioxidants,	87	Sulfamerazine,
Anti-inflammatories,	87	Sulfamethazine,
Oxidative stress,	104	Solubility,
Nitrosative stress,	104	van't Hoff model,
Yeast,	104	Apelblat modified model,
<i>Candida albicans</i> ,	104	Buchowski-Ksiazczak λh model,
Antifungal,	104	van't Hoff-Yaws model,
Natural products,	104	Two-parameter Weibull function model,
Glycolic acid,	159	Adherence to treatment,
Cosmetics products,	159	Older adult,
Quality control,	159	Medication,
Ergin,	175	Succinylcholine,
Electrochemical sensor,	175	Injectable,
Triazoles,	175	Development,
Amavadin,	175	Myristicaceae,
Conducting polymers,	175	Enzymatic activity,
Stable steady-state,	175	Phenolic compounds,
Recipes,	186	Non-specific intravenous human
Therapeutics groups,	186	immunoglobulin (IVIG),
Polypharmacy,	186	Drug utilization,
Salvarsan,	206	Off-label use,
		Thermal complex,
		Physical-chemical composition,
		Microbiological analysis,
		Therapeutic action,

Final disposal,	424	Hydrazone,	505
Drug use,	424	Polypharmacy,	523
Waste,	424	Hospitalized elderly,	523
Recycling,	424	Inappropriate prescription,	523
Drug storage,	424	Adverse drug events,	523
Synthetic peptides,	440	Pharmaceutical care,	534
Liposomes,	440	Veterinary pharmacy,	534
Microencapsulation,	440	Veterinary,	534
Physical-chemical analysis,	457	Prescription,	534
Microbiological analysis,	457	Hospital pharmacy,	534
Honey,	457	Patient safety,	534
Pollen,	457	Nimesulide,	550
Medications,	477	Biopolymer,	550
Internet,	477	Cross-linking,	550
Counterfeit drugs,	477	Release kinetics,	550
Coronavirus,	477	Essential oil,	571
Complex,	491	<i>Alpinia zerumbet</i> ,	571
Cream,	491	<i>Cymbopogon citratus</i> ,	571
Cream-gel,	491	Jacareúba,	xx-1
Extensibility,	491	Diabetes,	xx-1
β -lapachone,	505	drying process,	xx-1
α -lapachone,	505	Optimization,	xx-1
Molecular hybridization,	505	D-optimal design,	xx-1
Hydralazine,	505	<i>Calophyllum brasiliense</i> ,	xx-1
Isoniazid,	505		

Portugués			
Microbiologia,	7	Corante escuraína,	206
<i>Staphylococcus</i> ,	7	Oscilações eletroquímicas,	206
Técnicas de laboratório clínico,	7	Estado estacionário estável,	206
Fitoquímica,	30	Medicamentos antineoplásicos,	219
Atividade antioxidante,	30	Câncer,	219
Toxicidade,	30	Hibridação molecular,	219
Planta medicinal,	30	Fenil hidrazonas,	219
<i>Aedes aegypti</i> ,	49	Radicais livres,	238
Larvas,	49	Polifenóis,	238
Compostos voláteis,	49	<i>Euphorbiaceae</i> ,	238
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck,	49	<i>Phyllanthaceae</i> ,	238
Óleo destilado,	49	Fitoterapia,	254
Luliconazol,	63	Controle de qualidade,	254
Método indicativo de estabilidade,	63	Faringoamigdalite,	254
Degradação forçada,	63	Conservantes,	271
Produto de degradação,	63	Carcinogênese,	271
Estudos <i>in silico</i> ,	63	Nitratos,	271
Software Zeneth [®] ,	63	Nitritos,	271
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> ,	87	Sulfametazina,	294
polifenóis,	87	Sulfamerazina,	294
Antioxidantes,	87	Solubilidade,	294
Anti-inflamatórios,	87	Modelo van't Hoff,	294
Estresse oxidativo,	101	Modelo Apelblat modificado,	294
Estresse nitrosativo,	101	Modelo Buchowski-Ksiazaczak λb ,	294
Fungos,	101	Modelo van't Hoff-Yaws,	294
<i>Candida albicans</i> ,	101	Modelo Weibull de dois parâmetros,	294
Antifúngico,	101	Adesão ao tratamento,	326
Produtos naturais,	101	Idoso,	326
Ácido glicólico,	158	Medicamentos,	326
Produtos cosméticos,	158	Succinilcolina,	341
Controle de qualidade,	158	Injetável,	341
Ergina,	174	Desenvolvimento,	341
Sensor eletroquímico,	174	Myristicaceae,	354
Triazóis,	174	Atividade enzimática,	354
Amavadina,	174	Compostos fenólicos,	354
Polímeros condutores,	174	Imunoglobulina humana inespecífica	
Estado estacionário estável,	174	intravenosa (IVIG),	388
Receitas,	186	Uso de medicamentos,	388
Grupos terapêuticos,	186	Uso off-label,	388
polifarmácia,	186	Complexo térmico,	408
Salvarsan,	206	Composição físico-química,	408
Sensor eletroquímico,	206	Análise microbiológica,	408
Oxihidróxido de cobalto,	206	Ação terapêutica,	408
		Disposição final,	425
		Uso de medicamentos,	425

Resíduos,	425	Hidralazina,	507
Reciclagem,	425	Isoniazida,	507
Armazenamento de medicamentos,	425	Iidrazona,	507
Peptídeos sintéticos,	441	Polifarmácia,	524
Lipossomas,	441	Idoso hospitalizado,	524
Microencapsulação,	441	Prescrição inadequada,	524
Análise físico-química,	459	Eventos adversos a medicamentos,	524
Análise microbiológica,	459	Cuidados farmacêuticos,	533
Mel,	459	Farmácia veterinária,	533
Pólen,	459	Prescrição,	533
Medicamentos,	478	Veterinária,	533
Internet,	478	Farmácia hospitalar,	533
Medicamentos falsificados,	478	Segurança do paciente,	533
Coronavírus,	478	Nimesulida,	551
Complexo,	492	Biopolímero,	551
Creme,	492	Reticulação,	551
Creme-gel,	492	Cinética de liberação,	551
Extensibilidade,	492	Oleo essencial,	573
β -lapachona,	507	<i>Alpinia zerumbet</i> ,	573
α -lapachona,	507	<i>Cymbopogon citratus</i> ,	573
Hibridização molecular,	507		



NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), con una periodicidad cuatrimestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos, la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al Editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, al correo electrónico rcciquifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de 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 ϵ). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2,94).

IR ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: IR ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

EM m/z (% intensidad relativa). Ej.: em m/z (%): 340 (M^+ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3,84 (1H, *d*, J = 10,3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16,60 (t, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción

Referencias de los manuscritos

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, así:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la revista debe ir en letra *itálica*, volumen en **negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de: En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

Tesis: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, *título en cursiva*, Tesis de..., institución, ciudad, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, *Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas*, Tesis de Grado, Universidad del Valle, Cali, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista *rcciquifa_fcbog@unal.edu.co*

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias
Químico-Farmacéuticas
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.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(3)*
se terminó de editar en Proceditor,
en diciembre de 2021.
Bogotá, D. C., Colombia.

