

REVISTA FACULTAD DE

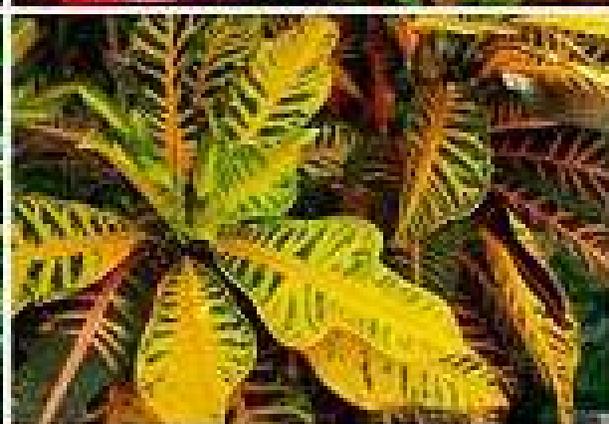
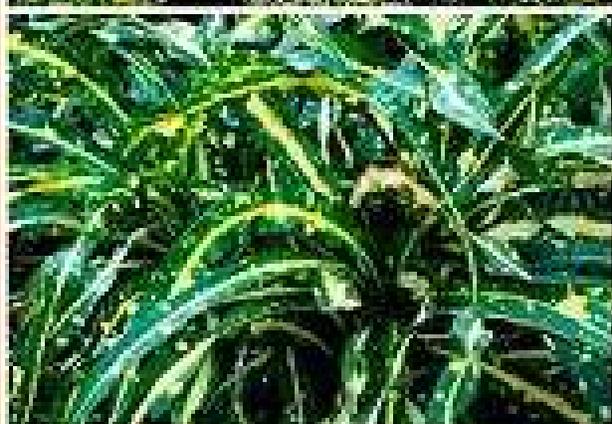
FARMACIA

Volumen 88

Nº 1 y 2

2023

ISSN: 0041-0317



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 86- Nos 1 y 2 - 2023
ISSN: 0041-8307
ISSN-e: 2739-0373
Depósito legal: 195902 DF 224
Caracas/Venezuela
Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

Universidad Central de Venezuela

Rectora

Dra. Cecilia García-Arocha

Vicerrector Académico

Dra. Ínirida Rodríguez Millan (E)

Vicerrector Administrativo

Dr. Amalio Belmonte (E)

Secretario

Dr. Amalio Belmonte

Facultad de Farmacia

Decana

Dra. Margarita Salazar-Bookaman

Directora

Dra. Enriqueta Rodríguez

Coordinadora Académica

Dra. Beth Díaz

Director del Instituto de Investigaciones

Dra. Isabel Andueza

Coordinadora de Extensión

Dra. Astrid Pinto

Revista Facultad de Farmacia

Editora

Dra. Anita Stern Israel

Comité Editorial

Dra. María Margarita Salazar-Bookaman

Dra. Alírica Suárez

Dr. Jaime Charris

Dra. Isabel Andueza

Dr. David De Souza

Dra. Miriam Regnault

Diagramación y montaje en línea

Yraiceles Jiménez (yrajimenez@gmail.com)

Dirección

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109
Caracas 1040-A - Venezuela

Portada: Diferentes Tipos de Croton

Tomado de: <https://www.guiadejardineria.com/distintos-tipos-de-plantas-de-croton/>

An update on phytochemistry and pharmacology of <i>Croton malambo</i> H. Karst ALÍRICA I SUÁREZ	3
Desarrollo de una línea de productos de cuidado facial dirigida a las estudiantes de la Facultad de Farmacia, UCV ANA CAMACHO, MARÍA CASTILLO, BLANCA GARCÍA, ADRIANA MARTÍNEZ, AYLIN MEDINA, PAOLA SALAZAR, KAREN ZAMBRANO, LUISA BUCARITO, MARÍA CONTRERAS, ALBIN ROMERO	14
Modelo <i>in vivo</i> de lesiones inducidas por la radiación no ionizante de microondas sobre larvas de mosquito <i>Aedes aegypti</i> MARCO A. ÁLVAREZ OCHOA, AURORA V. BARRIOS RUDAS, ELIANA NAVARRO SCIOSCIA	24
Desarrollo de geles masticables de ibuprofeno para pacientes pediátricos REINALDO J ARISTIMUÑO, OMAR G CARMONA, IVÁN A MOGNA, LEXANDRA D OLIVAR, ADRIANA P RAMOS, GREGORY J ROSAL	34
Propuesta para la estandarización de endotoxinas bacterianas y pirógenos en dos productos farmacéuticos parenterales por los métodos del lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> y la prueba de activación de monocitos ANDREA V REQUENA, MARLY SUÁREZ, MARIED ROJAS, ANA CARVAJAL, ANA AGATÓN, GENNY URQUÍA, HEISEL UROSA, IDAMELIS RODRÍGUEZ, MARÍA ISABEL CALDERÓN, GRICELIS MARTÍNEZ, MICHAEL R. MIJARES	44
Análisis comparativo de diferentes formulaciones de Anfotericina B y su incidencia sobre la seguridad del paciente) GABRIEL E HERNÁNDEZ ZAMBRANO, ANA P PEREIRA CORREIA, DANIEL A PIRE ÁLVAREZ, ESTHEFANY R REQUEZ CABRERA, GABRIELA A SIMOZA LÓPEZ	56
Optimización y validación de un método por RP-HPLC para determinación simultánea de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína en tabletas ANDREA C. GARCÍA RANAUDO, REEM MOHAMMAD ABDULKHALIK, ANDREA R ROJAS SEMINARIO, MARISABEL BOR	70
Estudio comparativo de dos excipientes para la elaboración de comprimidos bucodispersables LUNA Y DÍAZ BARBOSA, JULIO R LÓPEZ MARTÍNEZ, JENNIFER A PRADA MÁRQUEZ	83
Papel del receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de la aterosclerosis LETICIA FIGUEIRA, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ	93
Efecto comparativo de la actividad antioxidante del ácido gálico y diferentes alquilgalatos LYNG MEI RODRÍGUEZ, NATALIA RUIZ FLORES, DIANA SANGOI FERREIRA, ANA MILENA GUERRERO, CARLOS CIANGHEROTTI, JAIRO BERMÚDEZ, MARY LORENA ARAUJO, ANITA ISRAEL, MARISABEL BOR	100

Normas de publicación 117

Esta publicación fue parcialmente subvencionada por la Sociedad Venezolana de Ciencias Cosméticas



Esta Revista se publica bajo el auspicio del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Universidad Central de Venezuela.



CDCH-UCV

cdch-ucv.net

publicaciones@cdch-ucv.net



An update on phytochemistry and pharmacology of *Croton malambo* H. Karst

Actualización de la fitoquímica y farmacología de *Croton malambo* H. Karst

ALÍRICA I. SUÁREZ

Abstract

The genus *Croton* is one of the most characteristic groups of plants belonging to the Euphorbiaceae family. Under this genus is *Croton malambo* H. Karst, a tree found in the Guajira peninsula, shared by Colombia and Venezuela. The inhabitants of this region have used this plant as a treatment for rheumatism, body pain, wounds, bumps, local inflammation, dermal infection, toothache, umbilical infections, headaches, and bronchitis. This short review provides traditional knowledge, phytochemistry, and pharmacological studies of *C. malambo*. The literature reviewed for this article was obtained from the Web of Science, PubMed, ScienceDirect, and Google Scholar research published before March 2023, and own results. Phytochemical investigations reveal that the plant is a rich source of triterpenes, phenyl compounds, lignans, ent-kauranes, alkaloids, monoterpenes, and volatiles. The results of pharmacological tests on this plant indicate antidiabetic, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, and anticancer effects. This paper resume information on the phytochemical constituents and the pharmacological studies on extracts, compounds, and volatiles on *Croton malambo*. The purpose of this review is to stimulate future research that insides the potential of this species to obtain new medicinal agents in important diseases like diabetes and cancer.

Keywords: *Croton malambo*, traditional uses, phytochemical constituents, pharmacological studies

Resumen

El género *Croton* es uno de los grupos de plantas más característicos de la familia Euphorbiaceae. Bajo este género se encuentra *Croton malambo* H. Karst, un árbol que se encuentra en la península de la Guajira, compartida por Colombia y Venezuela. Los habitantes de esta región han utilizado esta planta como tratamiento para el reumatismo, dolor corporal, heridas, golpes, inflamación local, infección dérmica, dolor de muelas, infecciones umbilicales, dolor de cabeza y bronquitis. Esta breve revisión proporciona conocimientos tradicionales, fitoquímica y estudios farmacológicos de *C. malambo*. La bibliografía revisada para este artículo se obtuvo de las investigaciones de Web of Science, PubMed, ScienceDirect y Google Scholar publicadas antes de marzo de 2023 y resultados propios. Las investigaciones fitoquímicas revelan que la planta es una rica fuente de triterpenos, compuestos fenólicos, lignanos, ent-kauranos, alcaloides, monoterpenos y aceites esenciales. Los resultados de pruebas farmacológicas sobre esta especie indican efectos antidiabéticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, antinociceptivos y anticancerígenos. Este artículo resume la información sobre los constituyentes fitoquímicos y los estudios farmacológicos sobre extractos, compuestos y volátiles de *Croton malambo*. El propósito de esta revisión es estimular futuras investigaciones que profundicen en el potencial de esta planta para obtener nuevos agentes medicinales en enfermedades importantes como la diabetes y el cáncer.

Palabras clave: *Croton malambo*, usos tradicionales, constituyentes fitoquímicos, estudios farmacológicos

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: alirica1@yahoo.es.

Orcid: [0000-0002-3317-5179](https://orcid.org/0000-0002-3317-5179)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.2](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.2)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 29/03/2023

Aprobación: 21/04/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 03-13. 2023

Introducción

Croton genus belongs to the Euphorbiaceae family, one of the biggest in the plant kingdom; this consists of herbs, shrubs, and trees and, although less common, some appear as lianas. *Croton* is the largest genus of the Crotonoidae subfamily (Caruzo *et al.*, 2011), under its classification, have been reported approximately 1200 species distributed widely in tropical and subtropical regions of the continents (Berry *et al.*, 2005). In Venezuela, 79 species have been identified (Berry and Riina, 2008). Many species of this genus are endowed with medicinal properties, especially those that exudate red latex, for which some species are known as “sangre de drago”. The folk medicine of countries in Asia, Africa, and America had been used *Croton* species to treat, inflammations, diabetes, rheumatism, healing wound, and gastric illness, and as an analgesic agent (Salatino, 2007; Abega *et al.*, 2014; Langat *et al.*, 2020; Bezerra *et al.*, 2020; Luu-dam *et al.*, 2023).

Regarding the chemistry of *Croton* species, it is a rich genus in secondary metabolites, where families of compounds like alkaloids, flavonoids, glycosides, and terpenoids are common; between the terpenes, the diterpenes are the more important compounds in this classification, being clerodanes, tiglianones, kauranes, cembranes, labdanones, and crotonolones the common structures in many species (Xu *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2018).

Croton malambo H. Karst is a medium size tree that grows in the Venezuelan northwest region and in the northern part of Colombia, it is known by the folkloric names of palomatías, malambo, torco, and cáscara de lombrices, its bark and leaves

expel a pleasant aroma. Traditional uses of *C. malambo* have been documented by the people who inhabit the region where it grows, especially the Wayuu ethnic group, inhabitants of the Guajira peninsula, shared by Venezuela and Colombia (Figure 1). These people, maintain an ancient and rich culture in traditions and, folk medicine (Figures 2 and 3), the Wayuu, include this tree as one of the more used plants, to treat diverse illnesses and diseases. The traditional uses document the forms of poultices, baths, and plasters to treat rheumatism, body pain, wounds, bumps, local inflammation, dermal infection, toothache, umbilical infections, headache, and bronchitis. Drinks are used in disorders that can include dysphonia, tonsillitis, fainting, diabetes, diarrhea, stomach pain, belly pain, indigestion, difficulty labor, retained placenta, colds, and cough. Bark, leaves, and the whole plant are among the most commonly used parts of this species (Rosado *et al.*, 2010; Tillett *et al.*, 1997; Garcia-Barriga, 1992).



Figure 1. Guajira peninsula showed in green color. Taken from https://es.wikipedia.org/wiki/Pueblo_wayuu

This communication attempts to show an update on the phytochemical and pharmacological studies of *Croton malambo* (CM), which demonstrates its reputed medicinal uses and its therapeutic potential for future research.



Figure 2. Wayuu women with their typical costumes.
Taken from <https://venezuelaenarte.com>



Figure 3. The yonna, a traditional dance native to the Wayú people, is also known as chichamaya.
Taken from https://es.wikipedia.org/wiki/Pueblo_way

PHYTOCHEMISTRY

Croton malambo contains triterpenes, phenyl compounds, lignans, ent-kauranes, alkaloids, monoterpenes, and volatiles. The structures of these compounds are shown in Figures 4 and 5, and the pharmacological actions of these secondary metabolites are described in continuation. The major compound isolated from phytochemical studies of bark is t-dehydrocrotonin (1), a clerodane diterpene with relevant biological activities (da Costa *et al.*, 2007): hypoglycemic and hypolipidemic (Silva *et al.*, 2001), antigenotoxic (Agner *et al.*, 1999), antiulcerogenic (Rodríguez *et al.*,

2004), anti-inflammatory, antinociceptive (Perazo *et al.*, 2007), antiestrogenic (Luna-Costa *et al.*, 2007), cardiovascular (Silva *et al.*, 2005), antitumor (Grynberg *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2004), and trypanocidal (Campos *et al.*, 2010). Cajucarinolide (2) and isocajucarinolide (3) also belonging to the clerodanes diterpenes class, have been reported to have anti-inflammatory activity (Ichihara *et al.*, 1992). Other major compounds isolated from *C. malambo* bark are methyleugenol (4), a well-known monoterpene endowed with diverse pharmacological actions, antinociceptive effect (Yano *et al.*, 2006), anesthetic (Wang *et al.*, 2015), relaxant and antispasmodic (Lima *et al.*, 2000), anticancer (Yin *et al.*, 2018), and also with cardiovascular effects (Lahlou *et al.*, 2004). Methyleugenol (4), isoelimicine (5), and δ -cadinol (6) are present in the bark. The triterpene lupeol (7) is recognized with several biological properties such as anti-inflammatory, antitumor, antiprotozoal, and antimicrobial (Gallo and Sarachine, 2009), it is present in barks and leaves, also another ubiquitous triterpene, betulin (8) was found in the bark, this metabolite had been well investigated by their pharmacological actions: anti-HIV, antitumor, antimalarial, anti-inflammatory, infectious diseases, metabolic and cardiovascular disorders (Amiri *et al.*, 2020; Sami *et al.*, 2006). The stigmasterol was also present among the constituents of *C. malambo* barks (9), this sterol had been recognized with several biological activities on different metabolic disorders as anticancer, anti-osteoarthritis, anti-inflammatory, anti-diabetic, immunomodulatory, antiparasitic, antifungal, antibacterial, antioxidant, and neuroprotective properties (Bakrim *et al.*, 2022).

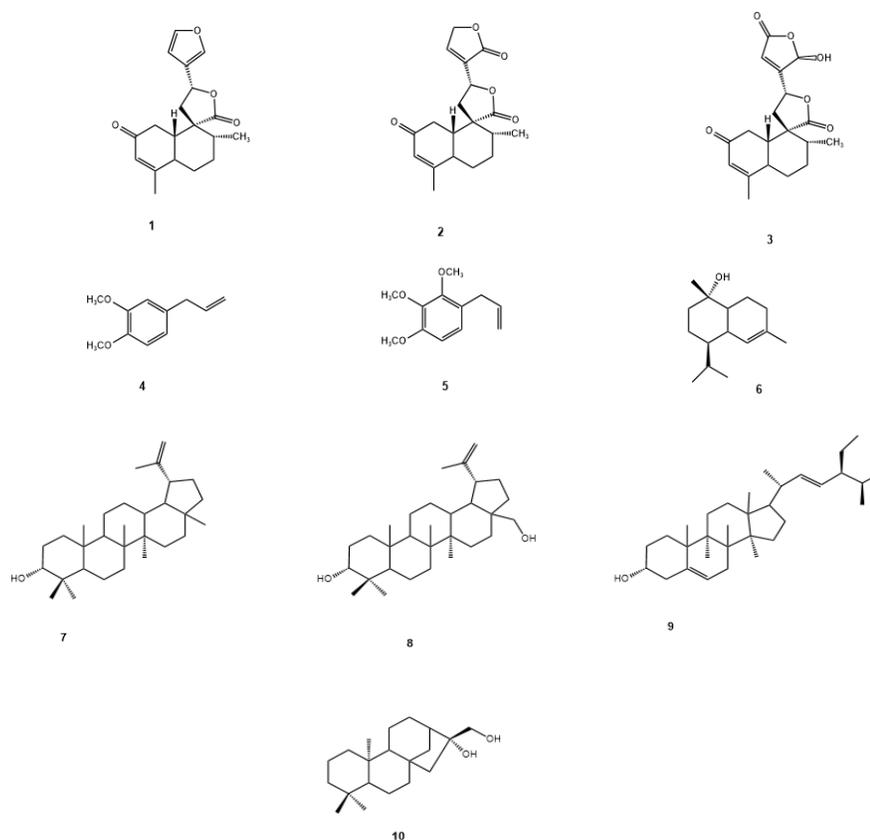


Figure 4. Isolated compounds from *Croton malambo* barks

Finally, the diterpene, 16 α , 17 β -diol-entkaurane (10) showed cytotoxicity and proapoptotic activity in human mammary carcinoma (Morales *et al.*, 2005) through a mechanism that includes Bcl-2 disruption of the Ap-2a/Rb transcription activating complex and induction of E2F1 up-regulation in MCF-7 cells (Morales *et al.*, 2011).

Those secondary metabolites previously described were isolated from *C. malambo* barks (Suárez, 2000), later the leaves were submitted to a phytochemical study, and a series of diterpenes isolated (Figure 5), the neo-clerodane ent-15,16-dihydroxy-cleroda-3,14-diene (11), ent-15,16-kauren-17-ol (12) and, 5-hydroxy-cis-dehydrocrotonin (13) which were evaluated as antibacterial and cytotoxic (Suárez *et al.*, 2014), and the bioactive glutarimidic alkaloids julocrotol (14) and julocrotone,

being reported by us with anti-inflammatory properties (15) (Suárez *et al.*, 2004; Mijares *et al.*, 2012) were also isolated from the leaf (Suárez *et al.*, 2014).

PHARMACOLOGY

An aqueous extract of *C. malambo* bark from Venezuela was evaluated in an animal test for acute toxicity, anti-inflammatory and antinociceptive activity, results are indicated here.

Acute toxicity

The TD₅₀ was determined according to Litchfield and Wilcoxon (1949) and acute toxicity was determined in mice. Different groups of animals were treated with a physiological solution and with increasing doses of *C. malambo* aqueous extract, in an intraperitoneal way. The LD₅₀ and TD₅₀

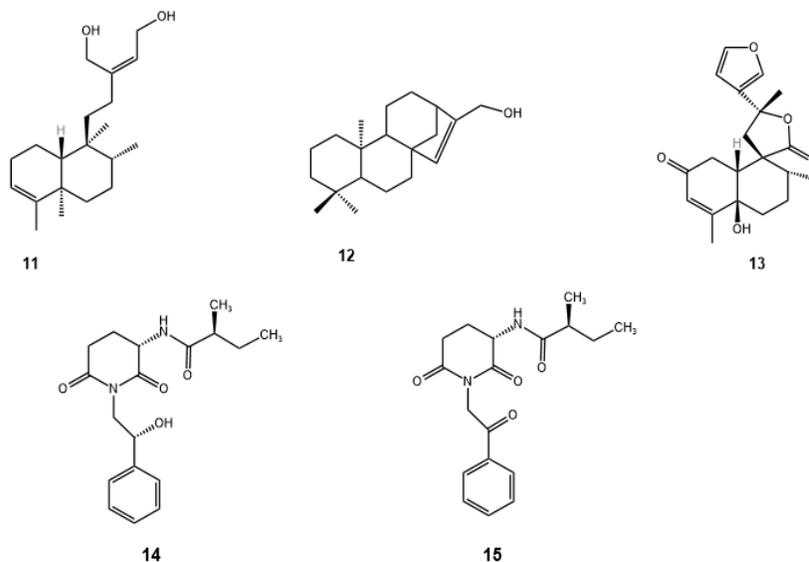


Figure 5. Isolated compounds from *Croton malambo* leaf

were obtained, and stereotypy was chosen to determine the TD_{50} because it was the most representative toxic effect observed in this test. At the highest dose tested, 4096 mg/kg, no mortality was observed (Suárez *et al.*, 2003)

Anti-inflammatory activity

To determine anti-inflammatory activity extract in rats, Winter *et al.* (1963) protocol was followed. Animals were divided into groups and pretreated with a physiological solution, acetylsalicylic acid, sodium diclofenac, and aqueous extract of *C. malambo*, by intraperitoneal (i.p.) treatment. Thirty minutes after treatment, 0.1 mL of an albumin solution 0.5% (w/v) was injected into the left hind paw of each rat. The volume of each treated leg was determined every 30 min up to 240 min using a plethysmometer.

Antinociceptive activity in mice

The antinociceptive activity of aqueous bark extract was assayed by thermal and chemical methods in experimental animals.

Details and results of these assays are given below.

Thermal method

The antinociceptive effect, expressed as the time required for mouse tail flick after exposure to a source of radiant heat, was evaluated according to Davies (1946). Animals were divided into groups, and treated as follows with physiological solution (Control group); acetylsalicylic acid (200 mg/kg, p.o.); morphine hydrochloride (3 mg/kg, i.p.), and with *C. malambo* aqueous extract (6 mg/kg, i.p.), respectively. Animals were exposed to radiant heat up to a maximum of 15s. The time required for mice tail flick was considered as the reaction time. Reaction time was recorded at 15, 30, 60, and 90 min after each treatment.

Chemical method

The animals' groups for this experiment were pretreated as follows: physiological solution (0.9%; 10 mL/kg, i.p.) (Control group); morphine hydrochloride (3 mg/kg, i.p.); acetylsalicylic acid (200 mg/kg,

p.o.); *C. malambo* aqueous extract (6.15 mg/kg, i.p.). At the time of peak effect for each drug, animals were treated with phenyl quinone (3mg/kg), and the number of animals presenting writhing syndrome, which consists of the contraction of the abdominal area with an extension of hind legs, was recorded.

The results obtained with the above-described experiments demonstrate that *C. malambo* bark aqueous extract has antinociceptive and anti-inflammatory effects. TD_{50} was determined to be 12.3 mg/kg (95% CI: 10.3-14.6 mg/kg). Because lethal effects were not observed at any of the administered doses, it was not possible to determine LD_{50} even at the highest dose tested. The results also demonstrate that *C. malambo* aqueous extract, reduced albumin-induced paw edema. Anti-inflammatory activity remained for the whole experimental period, and this effect was considered like that produced by acetylsalicylic acid. Data concerning antinociceptive effect indicated *C. malambo* aqueous extract produced a significant increase in mice reaction time in tail flick experiments which was maximum at 90 min. It revealed a considerable effect for treatment groups. *C. malambo* aqueous extract was effective in inhibiting phenyl quinone-induced writhing syndrome in mice (50% respect to control). This effect was similar to that produced by ASA and less than that caused by morphine (84%). The study suggests that this plant extract possesses an antinociceptive and an anti-inflammatory effect.

Antiproliferative activity

In a work screening of a few medicinal plants from the Colombian Caribbean, an alcoholic extract of *C. malambo*

was evaluated, and the antiproliferative action against cancer cells, H292 (mucoepidermoid carcinoma), and A549 (lung adenocarcinoma) was determined by the MTT method. The extract only showed moderated activity on H292 cells (Caro-Fuentes *et al.*, 2019),

Antidiabetic activity

Studies from our lab have shown the hypoglycemic and hypocholesterolemic activity of this plant in rats. The effect of the *C. malambo* aqueous extract on glucose-6-phosphatase (G6P) activity was realized in an animal model of diabetes-induced with alloxan. Results showed that *C. malambo* aqueous extract decreases enzyme activity depending on dosage and suggests that the extract may produce its hypoglycemic action through the restoration of the Langerhans islets (Suárez *et al.*, 2022, unpublished results).

ESSENTIAL OILS

The essential oils of barks and the leaf of *C. malambo* are a complex mixture of different compounds. The analysis of the *C. malambo* oil extracted from the barks of plants growing in Venezuela showed 36 constituents including traces, in which methyl eugenol (65.4%), methyl isoeugenol (6.3%), elemicine (4.7%), isoelemicine (3.4%), veratral (3.0%) and δ -cadinol (4.1%) were the major components (Suárez *et al.*, 2005) (Figure 3). The composition of the essential oil obtained from the leaves of these plants was also investigated, the major compounds present in this oil were found to be methyl eugenol (94.2 %); γ -bisabolene (1.3 %), isoelemicin (0.8 %) and γ -curcumene (0.8 %) were the minor compounds (Suárez *et al.*, 2008).

Other investigations of *C. malambo* from Colombia, have shown similar compounds with different concentrations, but in all of them, the major compound is methyleugenol (Jaramillo *et al.*, 2010; Jaramillo *et al.*, 2007; Muñoz-Acevedo *et al.*, 2014). In a study that described different extraction techniques for oil isolation, the results regarding the main components demonstrated previous findings (Jaramillo-Colorado *et al.*, 2014).

Pharmacology of essential oils

In recent years, pharmacological studies in Colombia have been conducted to explore the beneficial effects of *C. malambo* essential oils. Studies have shown antioxidant (Jaramillo *et al.*, 2010), acarycidal (Mendoza-Meza *et al.*, 2007), repellent, cytotoxic properties (Fuentes *et al.*, 2017), and acute toxicity against *Artemia salina* (Jaramillo *et al.*, 2007).

Antioxidant activity

The chemical composition of essential oils from plants of *C. malambo* growing in Colombia was investigated, and methyl eugenol (ME) was found to be the major compound. Determination of antioxidant activity was achieved using a discoloration assay of the stable radical cation ABTS+. The results indicated low antioxidant activity of the essential oil (Jaramillo *et al.*, 2010).

Cytotoxic activity

Another research from Colombia examined the chemical composition and the cytotoxicity of the total oil of leaves and branches of *C. malambo*, and the major compounds methyl eugenol and eugenol. They were submitted to assays of lymphocytes cytotoxicity test, and the results indicated a moderated cytotoxicity

for the total oil, and the major components methyleugenol and eugenol, with LC_{50} values between $310 \pm 17 - 897 \pm 11 \mu\text{g/mL}$, the authors mention that the pure essential oil of leaves was (310 ± 17), essential oil of branch (311 ± 5), methyleugenol (584 ± 34), and the more toxic was eugenol (897 ± 11). The toxicity *in vivo* was also investigated on Zebra fish embryos, the results showed that the most toxic in this assay was the eugenol with LC_{50} value (43 ± 9), followed by the essential oil of branches (28 ± 6) and methyleugenol (16 ± 9) (Muñoz-Acevedo, 2014).

Acute toxicity

The acute toxicity of an oil sample of *Croton malambo* plants, growing in Colombia was evaluated on *Artemia salina*, the results exposed with the $CL_{50} = 119.710 \mu\text{g/mL}$, are considered by the authors a low value, which means that the oil has low toxicity (Jaramillo *et al.*, 2007).

Acarycidal activity

The total essential oil obtained from *C. malambo*, and the major components, methyl eugenol and methyl isoeugenol were assayed on *Dermatophagoides farinae*. The results of acarycidal activity show that the oil has a high activity against *D. farinae*, with an LD_{50} of 262 ppm at 30 minutes of exposition. (Mendoza-Meza *et al.*, 2014).

Investigations of the pharmacological actions of the essential oils of *Croton malambo* plants from Venezuela, showing antibacterial and cytotoxic activity have been released, which are commented below.

Antibacterial activity

The antibacterial activity of *C. malambo* leaf essential oil was assayed *in vitro* by agar diffusion method against Gram-positive

bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and, the yeast *Candida tropicalis*. The effect of the pure oil and diluted oil was also compared to standard concentration antibiotics Amikacine, Norfloxacin, and Nystatine. The results showed that the oil from the leaves had antibacterial activity; especially the activity observed against *P. aeruginosa* is very important, because is a bacterium resistant to many antibiotics. The activity was also important for the fungal strain. The reference antibiotics showed the highest antimicrobial activity against all microorganisms and the pure essential oil was more active in all the bacterium. (Suárez *et al.*, 2008)

Cytotoxic activity

The cytotoxic activity in vitro of *C. malambo* leaf essential oil was evaluated against MCF-7 (human breast cancer), PC-3 (prostate carcinoma), LoVo (colon carcinoma), and normal fibroblast. All the cell lines were submitted to growing concentrations of essential oil (5, 15, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$). The results indicated that the oil was more active against cancer MCF-7 cells with an IC_{50} value of 72.84 %. This anticancer activity showed, suggested a selective effect against the MCF-7, which could be attributed to a synergistic effect of all components in the oil, like other oils from this genus, or maybe due to the high concentration of the principal component, the monoterpene methyl eugenol which showed some interesting biological activity, and because the related monoterpene eugenol had been reported with apoptotic activity on leukemia cells (Suárez *et al.*, 2008).

Conclusions

This review summarizes information regarding the traditional uses and phytochemical and pharmacological investigations of *Croton malambo*. Studies related to identifying the chemical constituents in leaves and barks showed that the main metabolites belonging to the terpenoid compounds are diterpenes with kaurane and neoclerodane structures. The essential oils of leaf and bark are well characterized and shown to be rich in phenylpropanoids like methyl eugenol. The diterpenes isolated from this plant are endowed with many pharmacological activities. The biological activities of extracts and pure compounds are mostly carried out in vitro experiments, however, the studies of antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer activities deserve deeper research on the active constituents of this plant, which evidenced the potential to obtain from its new pharmaceutical to treat these diseases.

References

- Abega DF, Kapche DWFG, Ango PY, Mapitse R, Yeboah SO, Ngadjui NT. 2014. Chemicals constituents of *Croton oligandrum* (Euphorbiaceae). *Z Naturforsch C* 69:181-185.
- Agner AR, Maciel MAM, Pinto AC, Pamplona SGSR, Cólus IMS. 1999. Investigation of Genotoxic Activity of Trans-Dehydrocrotonin, a Clerodane Diterpene from *Croton cajucara*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19: 377-384.
- Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, Mehrbod P, Khadem F, Behrouj H, Reza Aghanoori M-R, Machaj F, Ghamsari M, Rosik J, Hudecki A, Afkhami A, Hashemi M, Los MJ, Mokarram P, Madrakian T, Ghavami S. 2020. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnology Advances* 38: 107409.

- Bakrim S, Benkhaira N, Bourais I, Benali T, Lee LH, El Omari N, Sheikh RA, Goh KW, Ming LC, Bouyahya A. 2022. Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. *Antioxidants* 11(10):1912-1944.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. 2005. Molecular Phylogenetics of the Giant Genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-trnF DNA Sequence Data. *American Journal of Botany* 92(9): 1520-1534.
- Berry PE, Riina R. 2008. *Croton* - Euphorbiaceae. En: O. Hokche, P.E. Berry & O. Huber (eds). *Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela*: 366-379. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas.
- Bezerra FWF, Bezerra PdN, de Oliveira MS, da Costa WA, Ferreira GC, de Carvalho LN. 2020. Bioactive Compounds and Biological Activity of *Croton* Species (Euphorbiaceae): An Overview. *Current Bioactive Compounds* 16(4): 383-393.
- Campos MCO, Salomão K, Castro-Pinto DB, Leon LL, Barbosa HS, Maciel MAM, de Castro SL. 2010. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1193-1204.
- Caruzo MBR, van Ee BW, Cordeiro I, Berry PE, Riina R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in "Sacaca" clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 193-206.
- Da Costa MP, Magalhães NSS, Gomes FES, Maciel MAM. 2007. Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*, *Braz J Pharmacog* 17(2): 275-286.
- Caro-Fuentes DdC, Buendia-Ocampo YC, Ospina-Mateus LC, Salas-Díaz RD, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina LA. 2017. Colombian Caribbean extracts with antiproliferative activity against lung cancer cell lines. *Rev Cubana de Farmacia* 51(4): 1-11.
- Gallo MBC, Sarachine MJ. 2009. Biological Activities of Lupeol. *Internat J Biomedical and Pharmaceutical Sci* 3(1): 46-66.
- García Barriga, H. 1992. *Flora Medicinal de Colombia*. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia.
- Grynberg NF, Echevarría A, Lima JE, Pamplona SSR, Pinto AC, Maciel MAM. 1999. Anti-Tumour activity of two 19-Nor-clerodanes Diterpenes, trans-Dehydrocrotonin and trans-Crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med* 65: 687-689.
- Ichihara Y, Takeya K, Hitotsuyanagi Y, Morita H, Okuyama S, Suganuma M, Fujiki H, Motidome M, Itokawa H. 1992. Cajucarinolide and Isocajucarinolide: Anti-Inflammatory Diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Med* 58: 549-551.
- Jaramillo BE, Duarte E, Muñoz K, Stashenko E. 2010. Volatile chemical composition of essential oil from Colombian *Croton malambo* H. Karst. and determination of its antioxidant activity. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15(3): 133-142.
- Jaramillo BE, Olivero JT, Muñoz K. 2007. Composición Química Volátil y Toxicidad aguda (CI50) frente a *Artemia salina* del aceite esencial del *Croton malambo* colectado en la costa norte colombiana. *Scientia et Technica* 33: 299-302.
- Jaramillo-Colorado BE, Karena MC, Edisson DR, Stashenko E, Olivero VJ. 2014. Volatile Secondary Metabolites from Colombian *Croton malambo* (Karst) by Different Extraction Methods and Repellent Activity of its Essential Oil. *JEOBP* 17 (5): 992-1001.
- Lahlou S, Figueredo AF, Magalhaes PJC, Leal-Cardoso JH, Gloria PD. 2004. Cardiovascular effects of methyl eugenol, a natural constituent of many plants essential oils, in normotensive rats. *Life Sciences* 74: 2401-2412.
- Langat M K, Djuidjed EFK, Ndundae BM, Isyaka SM, Dolan, Ettridge GD, Whitmore H, Lopez I, Alqahtani AM, Ibrahim Atiku I, Jules S. Lobe JS, Eduard Mas-Claret E, Neil R. Crouch NR, Midiwo JO, Mulholland DA, Kamdem AKW. 2020. The phytochemical investigation of five African *Croton* species: *Croton oligandrus*, *Croton megalocarpus*, *Croton menyharthii*, *Croton rivularis* and *Croton megalobotrys*. *Phytochemistry Letters* 40: 148-155.
- Lima CC, Criddle DN, Coelho-de-Souza AN, Monte FJQ, Jaffar M, Leal-Cardoso JH. 2000. Relaxant and Antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. *Planta Med* 66: 408-411.
- Luna-Costa AM, Silva JCR, Campos AR, Rao VSN, Maciel MAM, Pinto AC. 1999. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. *Phytotherapy Research* 13(8): 389-391.
- Luu-dam NA, Le CVC, Satyal P, Le TMH, Bui VH, Vo VH, Ngo GH, Bui TC, Nguyen HH, Setzer WN. 2023. Chemistry and Bioactivity of *Croton* Essential Oils: Literature Survey and *Croton hirtus* from Vietnam. *Molecules* 28: 2361.
- Melo PS, Justo GZ, Duran N, Haun M. 2004. Natural killer cell activity and anti-tumor effects of

- dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. *European J Pharmacol* 487: 47-54.
- Mendoza-Meza D, Benavides-Henríquez H, Taborda-Martínez ME. 2014. Actividad acaricida del aceite esencial de la corteza de *Croton malambo* H. Karst, metil-eugenol y metil-isoeugenol contra *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961. *BLACPMA* 13 (6): 537-544.
- Mijares M, Martínez G, Chirinos P, Suárez AI, Compagnone RS, Blanco Z, De Sanctis JB. 2012. Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotina sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato forbol mirsitato. *Rev Fac Far UCV* 75: 25-32.
- Muñoz-Acevedo A, Puerto CE, Rodríguez JD, Aristazabal-Cordoba S, Kouznetsov VV. 2014. Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13 (4): 336-343.
- Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone RS, Suárez AI, Arvelo F, Ramírez JL, Galindo-Castro I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxy kaurane on humane mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters* 218: 109-116.
- Morales A, Alvarez A, Arvelo F, Suárez AI, Compagnone RS, Galindo-Castro I. 2011. The natural diterpene ent-16b-17a-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2a/Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. *Apoptosis* 16: 1245-1252.
- Perazzo FF, Carvalho JCT, Rodrigues M, Morais EKL, Maciel MAM. 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Brazilian J Pharmacog* 17(4): 521-528.
- Pollak-Eltz A. 2001. La medicina tradicional venezolana. Primera edición. Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, Venezuela.
- Rosado JR, Moreno MI. 2010. Farmacopea guajira: el uso de las plantas medicinales xerofíticas por la etnia wayuu. *Revista CENIC* 41: 1-10.
- Rodríguez JA, Hiruma-Lima CA, Souza-Brito ARM. 2004. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Human and Experimental Toxicol* 23: 455-461.
- Quattrocchini U. 2012. CRC World Dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. CRC Press -Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA.
- Salatino A, Salatino MLF, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry, and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc* 18: 11-33.
- Sami A, Taru M, Salme K, Jari Y-K. 2006. Pharmacological activities of the ubiquitous natural product botulin. *European J Pharm Sci* 29: 1-43.
- Shi S, Zhang H, Li S, Liu, Q, Song S. 2018. Review: diterpenoids from Croton genus (Euphorbiaceae) and their biological activity. *Asian J Traditional Medicines* 13(6): 242-262.
- Silva RM, Santos FA, Rao VSN, Maciel MA, Pinto AC. 2001. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3: 452-456.
- Silva RM, Oliveira FA, Cunha KMA, Maia JL, Maciel MAM, Pinto AC, Nascimento NRF, Santos FA, Rao VSN. 2005. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vascular Pharmacol* 43: 11-18.
- Suárez AI. 2000. Estudio Químico y Farmacológico de la corteza de *Croton malambo*. Trabajo de Ascenso para optar a la categoría de Profesor Agregado. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
- Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* 88 : 11-14.
- Suárez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone RS. 2004. Three New Glutarimide Alkaloids isolated From *Croton cuneatus*. *Natural Product Res* 18: 421-426.
- Suárez AI, Vásquez LJ, Manzano MA, Compagnone RS. 2005. Essential oil composition of Croton cuneatus and *Croton malambo* growing in Venezuela. *Flavour Fragr J* 20: 611-614.
- Suárez AI, Vásquez LJ, Taddei A, Arvelo F, Compagnone RS. 2008. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Leaf Essential Oil of *Croton malambo*. *J Essential Oil Bearing Plants* 11 (2): 208-213.
- Suárez AI, Taddei A, Sojo F, Arvelo F. 2014. Diterpenos bioactivos de *Croton malambo*. *Rev Fac Farm UCV* 77 (1, 2):8-15.
- Tillet S, Rosales MA, Suárez AI. (Capítulo de libro) El Jawaapi de los wayúu una nueva presentación

-
- de Medicina Herbaria, "Salud y ambiente Edt. FACES-UCV, 1997.
- Wang Z, Tabakoff B, Levinson SR, Heinbockel T. 2015. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. *Acta Pharmacologica Sinica* 36: 791-799.
- Xu WH, Liu WY, Liang Q. 2018. Chemical Constituents from Croton Species and Their Biological Activities. *Molecules* 23: 2333.
- Yano S, Susuki Y, Yusurihara M, Kase Y, Takeda S, Watanabe S, Aburad M, Miyamoto K. 2006. Antinociceptive effect of methyl eugenol of formalin-induced hyperalgesia in mice. *European J Pharmacol* 553: 99-103.
- Yin L, Sun Z, Ren Q, Su X, Zhang D. 2018. Methyl eugenol induces potent anticancer effects in RB355 human retinoblastoma cells by inducing autophagy, cell cycle arrest and inhibition of PI3K/mTOR/Akt signaling pathway. *J Balkan Union of Oncology (JBUON)* 23(4): 1174-1178.



Desarrollo de una línea de productos de cuidado facial dirigida a las estudiantes de la Facultad de Farmacia, UCV

Development of a facial care line of products for students in the Faculty of Pharmacy, UCV

ANA CAMACHO^{*1}, MARÍA CASTILLO², BLANCA GARCÍA³, ADRIANA MARTÍNEZ⁴, AYLIN MEDINA⁵, PAOLA SALAZAR⁶, KAREN ZAMBRANO⁷, LUISA BUCARITO⁸, MARÍA CONTRERAS⁹, ALBIN ROMERO¹⁰

Resumen

En las últimas décadas, la percepción del cuidado de la piel ha sido ampliada, por esta razón el mantenimiento de la integridad, uniformidad, tono, pigmentación, y en general el aspecto de la piel es de gran importancia en la calidad de vida de las personas. En este estudio se seleccionó como población a las estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (UCV), las cuales se caracterizan por no disponer suficiente tiempo para una rutina de cuidado de su piel y por tener factores estresantes relacionados a la exigencia académica de la carrera, lo que influye en su dedicación a mantener una rutina de cuidado facial. En consecuencia, se pretende formular y desarrollar una línea de productos destinada al cuidado facial acorde a las características y necesidades de la piel de la población estudiada, a través del análisis de los datos obtenidos mediante el enfoque cuantitativo y de tipo experimental, para así satisfacer las necesidades en común de las estudiantes y de este modo ayudar a mantener la piel de esta área en condiciones óptimas.

Palabras clave: Rutina, Estudiantes, Calidad, Formular, Desarrollar, Satisfacer, Foto envejecimiento, Pigmentación, Piel, Cosméticos

Abstract

In the last decades, the perception of skin care has been broadened, for this reason, the maintenance of the integrity, uniformity, tone, pigmentation, and in general, the appearance of the skin is of great importance in the quality of life of people. This study selected a population the students of the Faculty of Pharmacy of the Central University of Venezuela (UCV), who are characterized by not having enough time for a skincare routine and by having stress factors related to the academic demands of the career, which influences their dedication to maintain a facial care routine. Consequently, the aim is to formulate and develop a line of products for facial care according to the characteristics and needs present in the skin of the population studied, through the analysis of the data obtained according to the quantitative and experimental approach. to meet the common needs of the students and help maintain the skin in this area in optimal conditions.

Keywords: Routine, Students, Quality, Formulate, Develop, Satisfy, Photo aging, Pigmentation, Skin, Cosmetics

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: tecnologiacosmetica2022@gmail.com

Orcid: [10009-0007-3263-5990](https://orcid.org/0009-0007-3263-5990)

[60009-0002-6463-0709](https://orcid.org/0009-0002-6463-0709)

[20009-0006-0444-8808](https://orcid.org/0009-0006-0444-8808)

[70009-0008-6433-3716](https://orcid.org/0009-0008-6433-3716)

[30009-0006-2414-0632](https://orcid.org/0009-0006-2414-0632)

[80009-0000-4522-5121](https://orcid.org/0009-0000-4522-5121)

[40009-0003-4139-9978](https://orcid.org/0009-0003-4139-9978)

[90009-0002-0506-5615](https://orcid.org/0009-0002-0506-5615)

[50009-0005-6845-5436](https://orcid.org/0009-0005-6845-5436)

[*10009-0000-6634-1084](https://orcid.org/0009-0000-6634-1084)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.3](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.3)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 05/05/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 14-23. 2023

Introducción

Las estudiantes de la Facultad de Farmacia de la UCV se caracterizan por no disponer de tiempo suficiente para una rutina de cuidado de su piel y por tener factores estresantes relacionados a la exigencia académica de la carrera, lo que influye en su dedicación o en la cantidad de tiempo que emplean en mantener una rutina de cuidado facial. Esto es de gran importancia debido a que un régimen de cuidado de la piel puede tener un impacto positivo en la calidad de vida de las personas, ya que, se ha demostrado que el atractivo físico es un determinante importante de las relaciones interpersonales (Zhang y col., 2020), representando un grupo de interés para evaluar sobre sus tipos de piel, así como las rutinas de belleza empleadas actualmente por las mismas, entre otros aspectos relevantes.

La rutina de cuidado facial varía de acuerdo con el tipo de piel, debido a que los requerimientos y condiciones de cada uno son distintos (Noor y col., 2018).

Actualmente, existe un sistema de clasificación de los biotipos cutáneos llamado "Tipos de piel de Baumann" (Tabla I), en el que se pueden identificar 16 tipos de piel a través de un cuestionario exhaustivo. Los 16 tipos de piel están expresados por combinaciones de características, basándose en cuatro parámetros: hidratación de la piel (seca o grasa), sensibilidad de la piel (sensible o resistente), pigmentación de la piel (pigmentada o no pigmentada) y presencia de arrugas (con arrugas o estirada/sin arrugas) (Baumann y col., 2005).

De acuerdo con el tipo de piel las necesidades de la misma varían; en la

Tabla I.
Nuevos tipos de piel Baumann

	OS	OR	DS	DR
PW	OSPW	ORPW	DSPW	DRPW
PT	OSPT	ORPT	DSPT	DRPT
NW	OSNW	ORNW	DSNW	DRNW
NT	OSNT	ORNT	DSNT	DRNT

Fuente: Baumann y col., 2005.

Claves: **O** (Oil/Grasa), **D** (Dry/Seca), **S** (Sensitive/Sensible), **R** (Resistant/Resistente), **P** (Pigmented/Pigmentada), **N** (Non pigmented/No pigmentada), **W** (Wrinkled/Arrugada), **T** (Tight/Estirada)

piel seca la rutina debe centrarse en la reparación de la barrera cutánea y en la reducción de la exposición al sol, donde los activos más utilizados son: ácidos grasos, ceramidas y colesterol (Baumann, 2008). Por el contrario, el perfil de cuidado facial para la piel grasa acompañada o no de acné debe centrarse en la reducción de los niveles de sebo (Baumann, 2008).

Así mismo, para pieles que presentan pigmentación la rutina se centra en reducir la misma; entre los activos más eficaces se encuentran vitamina C, ácido kójico, arbutina, extracto de regaliz, niacinamida, alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos y retinoides (Baumann, 2008).

Una rutina básica de cuidado facial generalmente está compuesta por un producto limpiador, un hidratante y protector solar.

La presente investigación se centra en el estudio de las características de la piel y los puntos claves necesarios para establecer y desarrollar productos adecuados para el cuidado del rostro de la población estudiada, a través del análisis de los datos obtenidos en una encuesta realizada, con la finalidad de una línea de productos de cuidado facial que satisfaga las necesidades

en común que se encuentren y de este modo ayudar a mantener la piel de esta área en condiciones óptimas (Baumann y col., 2014; Baumann, 2016).

Por ello el objetivo fue desarrollar una línea de productos de cuidado facial dirigida a las estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Para ello, se procedió a 1. clasificar el tipo de piel, 2. A formular una línea de productos cosméticos de cuidado facial, y 3. A caracterizar la línea de productos cosméticos de cuidado facial de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas.

Metodología

La investigación se basa en un enfoque cuantitativo y de tipo experimental, para lo cual se realizará la recolección de datos mediante una encuesta, y el análisis de datos que permita el desarrollo de una formulación de la línea de productos. Esta se realizará previa revisión bibliográfica de los componentes y empleando el método de ensayo y error.

Una vez obtenidas las formulaciones, se procederá a caracterizar cada una de ellas de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas (pH, viscosidad, densidad, comportamiento reológico) y organolépticas (color, olor, textura).

Resultados y Discusión

En la encuesta participaron 70 estudiantes de sexo femenino de la Facultad de Farmacia de la UCV, las cuales aceptaron en su totalidad brindar información

voluntariamente respecto a su rutina de cuidado facial.

En base a los resultados, las estudiantes refieren un gran interés en su rutina de cuidado facial y los productos que utilizan en la misma. Siguiendo parámetros como el aspecto de su rostro luego de lavarlo, la sensación de la piel al tacto, el aspecto de sus poros, así como las necesidades que desean cubrir, se concluye que la mayoría de las participantes presentan un tipo de piel normal a grasa, por tanto, la formulación de los productos se basó en dicho resultado.

Adicionalmente, la mayoría de las participantes indicaron no presentar arrugas, descamación, enrojecimiento, rash, ni pigmentación en el rostro, a excepción al área del contorno de ojos, donde el oscurecimiento de dicha zona representa el principal problema a tratar.

En consecuencia, la clasificación de la piel de la mayoría de las estudiantes, de acuerdo con el sistema de clasificación de los biotipos cutáneos llamado "Tipos de piel de Baumann", se ajusta al tipo: ORNT, es decir, Grasa (Oil); Resistente (R); No pigmentada (N); Estirada (Tight) (Baumann y col., 2005).

Por tanto, se encontró que los productos necesarios para cubrir las necesidades de cuidado facial de las estudiantes de Farmacia, donde se toma en cuenta su tipo de piel, características especiales y tiempo de dedicación a la rutina, son: limpiador espumoso facial, contorno de ojos y crema hidratante de día con protector solar. De esta manera se abarcan los tres pasos principales de una rutina de cuidado facial como lo es la limpieza, hidratación y protección solar, incluyendo activos cosméticos en cada una de las

formulaciones que potencian el efecto deseado.

La línea de productos cosméticos cuenta con un ingrediente en común para todos sus productos, ampliamente conocido por las participantes de la encuesta y con múltiples beneficios en la piel: el colágeno, ingrediente que retiene la hidratación de la epidermis, mejorando la elasticidad, firmeza a la piel, evitando así la formación de arrugas a largo plazo. La elección de este activo asegura la adherencia de las participantes al uso de dichos productos, debido a que aporta beneficios que las mismas buscan en su piel, tomando en cuenta que se encuentran en un rango de edad superior a los 20-25 años, edad donde la producción de colágeno endógena comienza a disminuir, por lo que aumentan las probabilidades de observar algunos signos de envejecimiento en la piel (González y col., 2017).

La primera formulación en la línea de productos cosméticos lo constituye un limpiador facial en presentación de gel para piel grasa (Tabla II), el cual es de aplicación fácil y agradable, permitiendo el control del sebo en el rostro.

Este limpiador facial contiene como activos cosméticos: extracto de Hamamelis, el cual confiere un efecto astringente; ácido salicílico, un agente exfoliante, seborregulador y bacteriostático; colágeno soluble, un agente hidratante, que restituye la hidratación y luminosidad a la piel; y un activo hidratante basado en la combinación de algas y plantas acuáticas asiáticas, cuyo mecanismo consiste en la retención de agua en la piel y la regeneración celular.

La fórmula posee el poder limpiador ideal para un producto destinado a la limpieza del rostro de una piel grasa, los activos

cosméticos ejercen un efecto sinérgico que favorecen la limpieza profunda de los poros, controlando el sebo y los puntos negros, sin resecar ni maltratar la piel, cubriendo así diversas necesidades que expresan las estudiantes encuestadas. Las características fisicoquímicas y organolépticas del limpiador se expresan en la Tabla V.

El gel limpiador facial para piel grasa presenta un comportamiento reológico de un fluido No Newtoniano, pseudoplástico a 25°C ya que su viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de velocidad (Figura 1).

Adicionalmente se observa un comportamiento reopéxico en la formulación, es decir aquellos cuya viscosidad aumenta con la tensión a lo largo del tiempo. Efectivamente, al hacer la medición de la viscosidad de la formulación a velocidad descendente, se observa que la misma incrementa, incluso por encima de los valores obtenidos en la medición ascendente de viscosidad. Por otra parte, se evidencia en la formación un anillo de histéresis, el cual representa la diferencia de los valores de viscosidad obtenidos durante las mediciones ascendentes y descendentes, y el mismo se debe al retraso que se produce en la estructura del producto al adaptarse al cambio (Peña, 2020), el cual puede dar indicios de la estabilidad de la formulación en el tiempo.

Con el fin de afrontar el problema principal de la pigmentación en el área del contorno de ojos, se diseña un gel emulsificado (Tabla III), formulado con diversos activos cosméticos que aumentan la circulación de sangre en el área y unifican el tono de la ojera mientras retienen la humedad e hidratan la piel.

Tabla II.
Fórmula cuali-cuantitativa del limpiador facial para piel grasa

FASES	INGREDIENTES	%p/p	JUSTIFICACIÓN
A	Sodium Laureth Sulfate (70% m.a)	6,58	Tensoactivo aniónico
	Cocamida DEA	2,0	Estabilizador de espuma
	Colágeno Soluble	1,0	Activo cosmético (Hidratante, antiedad)
	Fragancia	0,8	Fragancia
	Agua	50,0	Vehículo
B	Ácido Salicílicos	1,0	Activo cosmético (Bacteriostático, seborregulador, exfoliante)
	Alcohol	4,0	Solvente
	Propilen glicol	2,0	Humectante
C	EDTA Disódico	0,1	Agente quelante
	DMDM Hydantoin	0,6	Preservante
	<i>Hamamelis virginiana</i> Leaf Extract	1	Activo cosmético (Astringente)
	Glycerin (and) propylene glycol (and) hydrogenated starch hydrolysate (and) panthenol (and) <i>Bambusa vulgaris</i> shoot extract (and) nelumbo nucifera flower extract (and) nymphaea alba root extract	1	Activo cosmético (Hidratante, antiedad)
	Agua	18,42	Vehículo
D	Cocamidopropyl Betaine (30% m.a)	10,50	Tensoactivo anfótero
E	Cloruro de sodio	1	Modificador reológico

Fuente: Datos propios

La fórmula está enriquecida con extracto de semillas de café (Shatalebi y Ahmadraji, 2015), el cual es un activo antioxidante y estimulante de la microcirculación; extracto de flores de manzanilla, calmante y tónico; extracto de centella asiática como regenerador e hidratante (Ratzyko y col., 2016); colágeno soluble como hidratante y anti-edad; así como aceite de almendras dulces y la manteca de karité como emolientes (Gil-Castaño y Cardona, 2020). Las características fisicoquímicas y organolépticas del contorno de ojos se presentan en la Tabla VI.

El gel emulsificado para el contorno de ojos presenta el comportamiento reológico característico de esta forma cosmética, fluido No Newtoniano, pseudoplástico a 25°C (Figura 2), en el cual la viscosidad del sistema disminuye al aumentar el gradiente de velocidad. Al realizar la medición de la viscosidad en orden descendente de velocidad, la viscosidad del producto aumenta rápidamente, obteniendo valores por encima a la medición en orden ascendente de velocidad, es decir presenta un comportamiento de un fluido reopéxico, hasta llegar a la velocidad

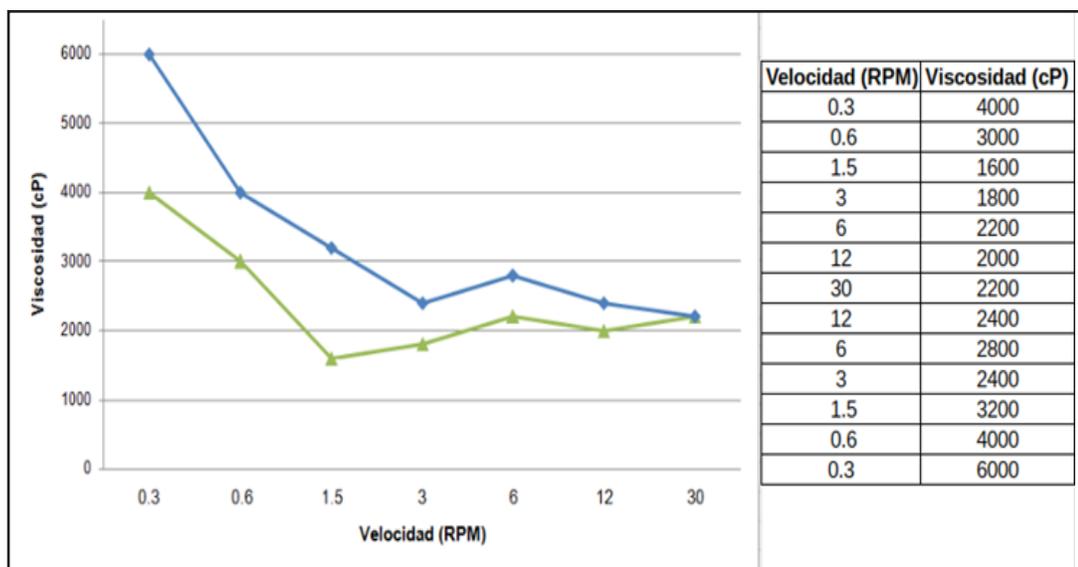


Figura 1. Reograma del limpiador facial para piel grasa.

Fuente: Datos propios. Valores medidos con el viscosímetro Brookfield LV a 25°C. RPM=Revoluciones por minuto, cP=Centipoise.

Tabla III.

Fórmula cuali-cuantitativa del contorno de ojos

FASES	INGREDIENTES	%p/p	JUSTIFICACIÓN
A	Agua	75,40	Vehículo
	Glicerina	5,0	Humectante
	Hidroxietilcelulosa	1,0	Modificador reológico
	DMDM hydantoin	0,60	Preservante
	Tetrasodium EDTA	0,20	Agente quelante
B	Cetareth-6, Stearyl Alcohol	3,0	Agente emulsificante
	Glyceryl Stearate	3,0	Agente de cuerpo
	Isopropyl Myristate	3,0	Emoliente
	Butyrospermum Parkii Butter	1,0	Emoliente
	Dimethicone	0,5	Emoliente
	Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet Almond) Oil	1,0	Emoliente
C	Coffea Arabica (Coffee) Seed Extract	1,0	Activo cosmético (Antioxidante, estimulante de la microcirculación)
	Chamomilla Recutita (Matricaria) Flower Extract	0,80	Activo cosmético (Tónico, calmante)
	Soluble collagen	1,0	Activo cosmético (Hidratante, antiedad)
	Centella Asiatica Leaf Extract	3,0	Activo cosmético (Regenerador, hidratante)
D	Tocopheryl acetate	0,2	Antioxidante
E	Fragancia	0,3	Fragancia

Fuente: Datos propios

Tabla IV.

Fórmula cuali-cuantitativa de la crema hidratante de día con protector solar

FASES	INGREDIENTES	%p/p	JUSTIFICACIÓN
A	Ceteareth 12	2,0	Emulsificante
	Ceteareth 20	2,0	Emulsificante
	Cetyl alcohol	3,6	Agente de cuerpo
	Glyceryl stearate	5,1	Agente de cuerpo
B	Cetearyl Ethylhexanoate, Isopropyl Myristate	7,0	Emoliente
	Butyl Methoxydibenzoylmethane	4,0	Filtro orgánico UV-A
	Octocrileno	9,0	Filtro orgánico UV-B
	Polysilicone-15	3,0	Emoliente/Filtro orgánico UV-B
C	Glicerina	3,0	Humectante
	DMDM hydantoin	0,6	Preservante
	Hydroxyethylcellulose	0,2	Agente suspensor
	Disodium EDTA	0,2	Agente quelante
	Agua	55,4	Vehículo
D	Titanium Dioxide	2,0	Filtro inorgánico UVA-UVB
E	Colágeno Hidrolizado	1,0	Activo cosmético (Hidratante, antiedad)
	Glycerin (and) propylene glycol (and) hydrogenated starch hydrolysate (and) panthenol (and) bambusa vulgaris shoot extract (and) nelumbo nucifera flower extract (and) nymphaea alba root extract	1,5	Activo cosmético (Hidratante, antiedad)
F	Tocopheryl acetate	0,2	Antioxidante
G	Fragrancia	0,2	Fragrancia

Fuente: Datos propios

Tabla V.

Características fisicoquímicas y organolépticas del limpiador facial para piel grasa

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Gel fluido
Color	Translúcido
Olor	Característico
pH	4,21
Viscosidad (Aguja 4; 3 RPM)	1.800 cP
Densidad relativa (25 °C)	1,0282 g/mL

Fuente: Datos propios

Tabla VI.
Características fisicoquímicas y organolépticas
del contorno de ojos

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Gel emulsificado homogéneo, evanescente y suave al tacto
Color	Beige claro
Olor	Característico
pH	6,42
Viscosidad (Aguja 4; 3 RPM)	30.000 cP
Densidad relativa (25 °C)	0,9601 g/mL

Fuente: Datos propios

de 0,6 RPM, donde existe un punto de equilibrio y posteriormente cambia el comportamiento del fluido y pasa a ser un fluido tixotrópico, los cuales pertenecen a una categoría de fluidos clasificados conforme a su comportamiento reológico como no newtonianos y dependientes del tiempo. Efectivamente, se observa que la formulación disminuye su viscosidad al aplicar un esfuerzo cortante, debido a que se evidencia una viscosidad inferior a la medida inicial antes de someter el sistema al gradiente de velocidad (Peña, 2020).

Igualmente, la formación presenta un pequeño anillo de histéresis, generado por el tiempo en el cual se recupera la

viscosidad inicial del contorno de ojos, el cual puede dar indicios de la estabilidad de la formulación en el tiempo.

La hidratación y la protección solar del rostro son dos pasos fundamentales en toda rutina de cuidado facial, por ello, con el uso de un producto con ambas funciones, se garantiza una humectación de la piel a largo plazo, así como la protección contra los daños de las radiaciones ultravioleta (UV), que como bien se sabe son responsables directos del envejecimiento prematuro de la piel, la hiperpigmentación e inclusive el cáncer de piel (González y col., 2017). Por esta razón es importante reforzar el uso diario del mismo en la rutina de cuidado facial. Para este fin se seleccionó una crema hidratante de día con protector solar (Tabla IV). Dicha protección es de naturaleza híbrida, debido a que combina filtros UV-A y UV-B, confiriendo la característica de protección solar de amplio espectro de FPS 25.6 (Factor de Protección Solar) y UVA-PF (Factor de protección contra UV-A) in vitro de 16.7, siguiendo las normas ISO 24444 y 24443. Para la determinación de dichos valores, se empleó el simulador de protección solar DSM Sunscreen Optimizer, basado en los diferentes filtros solares incluidos en la fórmula y sus concentraciones (DSM Sunscreen Optimizer™, 2023).

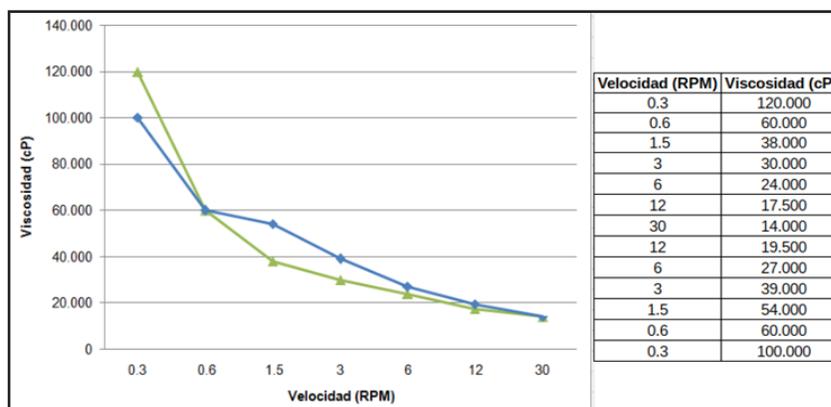


Figura 2. Reograma del contorno de ojos

Fuente: Datos propios. Valores medidos con el viscosímetro Brookfield LV a 25°C.
RPM=Revoluciones por minuto, cP=Centipoise

Adicionalmente, la fórmula contiene colágeno hidrolizado y un complejo de extractos de algas y plantas acuáticas asiáticas como activos cosméticos hidratantes de larga duración y anti-edad. Las características fisicoquímicas y organolépticas de la crema hidratante de día con protector solar se expresan en la Tabla VII.

Tabla VII.

Características fisicoquímicas y organolépticas de la crema hidratante de día con protector solar

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Crema homogénea, evanescente y suave al tacto
Color	Blanco
Olor	Característico
pH	7,04
Viscosidad (Aguja 4; 3 RPM)	104.000 cP
Densidad relativa (25 °C)	0,9545 g/mL

Fuente: Datos propios

Este producto presenta el comportamiento reológico característico de esta forma cosmética, fluido No

Newtoniano, pseudoplástico a 25°C (Figura 3), donde la viscosidad disminuye con el aumento del gradiente de velocidad. Durante el estudio reológico en la fase descendente de velocidad, se evidenció un aumento progresivo y rápido de la viscosidad de la crema, obteniéndose valores incluso superiores a los obtenidos en la fase ascendente, demostrando un comportamiento reopéxico y la formación de un anillo de histéresis, proporcionando indicios estabilidad del producto en función del tiempo.

Es de gran interés en este tipo de formulaciones el comportamiento pseudoplástico, el cual se define como aquellos fluidos que disminuyen su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada. Este comportamiento reológico facilita la aplicación y extensibilidad de las fórmulas sobre la piel, pues se produce una disminución de la viscosidad a medida en la que se frota sobre la superficie corporal. Por contraparte, bajo condiciones de reposo y baja velocidad de corte, las

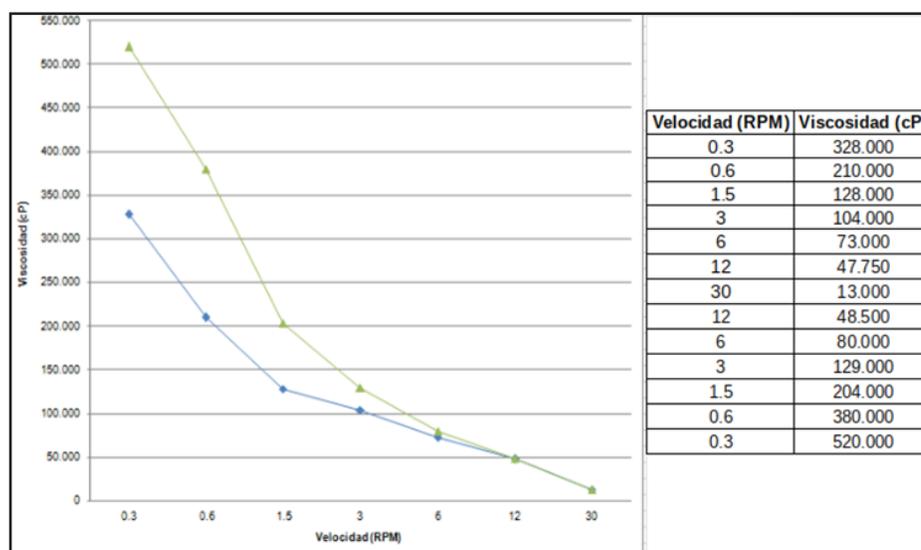


Figura 3. Reograma de la crema hidratante de día con protector solar
Fuente: Datos propios. Valores medidos con el viscosímetro Brookfield LV a 25°C.
RPM=Revoluciones por minuto, cP=Centipoise

3 fórmulas demuestran una viscosidad elevada favoreciendo la estabilidad en los envases por disminución de choque entre las partículas.

Conclusiones

Se propuso y desarrolló una línea de productos de cuidado facial que permita satisfacer las necesidades de las estudiantes de la Facultad de Farmacia de la UCV. De acuerdo con los activos utilizados, las fórmulas propuestas y los productos finales desarrollados se enfoca en satisfacer las necesidades de la población de estudio, creando una rutina de cuidado facial sencilla, rápida y con los productos necesarios para promover la mejoría del estado de su piel y a su vez, su calidad de vida.

Se realizó la caracterización de los productos formulados, incluyendo el análisis del comportamiento reológico, que permitió establecer las propiedades de las formulaciones que conforman la línea de productos desarrollados.

Recomendaciones

Se sugiere estudios de estabilidad de las fórmulas desarrolladas de estabilidad natural y acelerada, así como el estudio de efectividad *in vivo*, que permitan validar la eficacia de los productos y los cambios visibles en la apariencia de la piel.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Mención Tecnología Cosmética de la Universidad Central de Venezuela el espacio proporcionado para la realización del trabajo, así como los equipos y la materia prima utilizada para el

desarrollo de la línea cosmética. Agradecen también a la población estudiada: estudiantes de la Facultad de Farmacia de la UCV.

Referencias bibliográficas

- Baumann L. 2008. Understanding and treating various skin types: The Baumann Skin Type Indicator. 26(3):359-73, vi.
- Baumann L. 2016. Validation of a Questionnaire to Diagnose the Baumann Skin Type in All Ethnicities and in Various Geographic Locations. J Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications 06(01):34-40.
- Baumann LS, Penfield RD, Clarke JL, Duque DK. 2014. A Validated Questionnaire for Quantifying Skin Oiliness. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications 04(02):78-84.
- Baumann L, Amini S, Weiss E. 2005. Nueva clasificación de los tipos de piel y sus implicaciones en Dermatología Cosmética. Dermatología Venezolana. 43(4): 4-7.
- DSM Sunscreen Optimizer™. 2023. DSM Sunscreen Optimizer™. Disponible: <https://www.sunscreen-optimizer.com/>.
- Gil-Castaño G, Cardona R. 2020. Emolientes: beneficios, elementos clave y aplicación clínica. Revista Alergia México 67(2):128.
- González E, Errasti T, Guerra A. 2017. Envejecimiento cutáneo: causas y tratamiento. Más Dermatol 29:4-12.
- Mancilla MM. 2017. Cosmetología y patologías de la piel <https://digitk.areandina.edu.co/bitstream/handle/areandina/1248/Cosmetología%20y%20patologías.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Noor NM, Muhamad NJ, Sahabudin NA, Mustafa Z. 2018. Development of Skin Care Routine Support System. Advanced Science Letters 24(10):7830-3.
- Peña W. 2020. Dinámica de líquidos tixotrópicos y dependientes del tiempo. Revista Ciencias Tecnológicas de Agrollanía 19 (1): 39-46.
- Rähse W. 2013. Design of Skin Care Products. In Product Design and Engineering. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 273-313.
- Ratz-Łyko A, Arct J, Pytkowska K. 2016. Moisturizing and anti-inflammatory properties of cosmetic formulations containing Centella asiatica extract. Indian J Pharm Sci 78(1):27-33.
- Shatalebi M, Ahmadraji F. 2015. Evaluation of the clinical efficacy and safety of an eye counter pad containing caffeine and vitamin K in emulsified Emu oil base. Advanced Biomedical Research 4(1):10.
- Zhang L, Adique A, Sarkar P, Shenai V, Sampath M, Lai R, Qi J, Wang M, Farage MA. 2020. The Impact of Routine Skin Care on the Quality of Life 7(3):59.



Modelo *in vivo* de lesiones inducidas por la radiación no ionizante de microondas sobre larvas de mosquito *Aedes aegypti*

Non-ionizing microwave radiation injuries on *Aedes aegypti* mosquito larvae in vivo model

MARCO A. ÁLVAREZ OCHOA^{*1}, AURORA V. BARRIOS RUDAS², ELIANA NAVARRO SCIOSCIA³

Resumen

Se evaluaron las lesiones de naturaleza térmica y no térmica inducidas por la radiación de microondas no ionizantes en el modelo experimental no convencional denominado *Aa-global-Tox*. Distintas poblaciones larvárias fueron sometidas a una fuente de radiación microondas de 2450 MHz, con una densidad de potencia promedio de 5 mV/cm², durante 1, 3, 6, 9, 12 y 15 segundos de exposición. Se midió la temperatura y se usó el Azul de Toluidina 0,5% para evaluar las lesiones generalizadas. La validación de los daños se realizó comparando con el agente tóxico KCl. El tiempo-temperatura letal medio, $T_{1/2}$, fue de 6,3 segundos. Bajo la condición letal y supraletal, se obtuvo un alto porcentaje de mortalidad larvaria acompañada por severas lesiones de quemadura. Bajo la condición subletal se obtuvo la reducción del 51,68% de la actividad motora, acompañada por un índice de variabilidad de 62,21±1,8 rad/s y se obtuvo una reducción del 52,25% de la actividad cardíaca contráctil, acompañada por un índice de variabilidad de 62,40±4,7. Los respectivos índices para el KCl fueron de 62,18±3,7% y de 55,23±1,78%, respectivamente, a una CI_{50} de 48,62 mM. El modelo no convencional de larvas del mosquito *Aedes aegypti* resultó ser un modelo para evaluar las lesiones de naturaleza térmica y no térmica inducidas por la radiación de microondas, conociendo la frecuencia de la fuente de emisión, la densidad promedio de la potencia incidente y estableciendo la temporalidad de los efectos a través de la relación tiempo-temperatura-lesión inducida. Dichas lesiones pudieron ser consecuencia de un fenómeno diferencial de "calentamiento dieléctrico".

Palabras clave: Larvas L4 *Aedes aegypti*, radiación microondas, lesiones térmicas y no térmicas, calentamiento dieléctrico, índices de variabilidad

Abstract

The thermal and non-thermal nature lesions induced by non-ionizing microwave radiation were studied in the unconventional experimental model called *Aa-global-Tox*. Different larval populations were subjected to a 2450 MHz microwave radiation source, with an average power density of 5 mV/cm², for 1, 3, 6, 9, 12, and 15 seconds of exposure. The temperature was measured and Toluidine Blue 0.5% was used to assess generalized lesions. The validation of the damages was carried out by comparing it with the toxic agent KCl. The median lethal time temperature, $T_{1/2}$, was 6.3 seconds. Under the lethal and supraletal conditions, a high percentage of larval mortality was obtained accompanied by severe burn injuries. Under the sublethal condition, a 51.68% reduction in motor activity was obtained, accompanied by a variability index of 62.21±1.8 rad/s, and a 52.25% reduction in cardiac contractile activity was obtained, accompanied by a variability index of 62.40. ±4.7. The respective ratios for KCl were 62.18±3.7% and 55.23±1.78%, respectively, at a CI_{50} of 48.62 mM. The unconventional model of larvae of the *Aedes aegypti* mosquito turned out to be a model to evaluate injuries of a thermal and non-thermal nature induced by microwave radiation, knowing the frequency of the emission source, the average density of the incident power and establishing the temporality of the effects through the relationship time-temperature-induced injury. Said injuries could be the consequence of a differential phenomenon of "dielectric heating".

Keywords: L4 *Aedes aegypti* larvae, microwave radiation, thermal and non-thermal injuries, dielectric heating, variability indices

Sección de Microscopía, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. Correspondencia: alvarezmenator@gmail.com.

Orcid: [0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)

²[0000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)

³[0000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.4](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.4)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 10/04/2023

Aprobación: 08/05/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 24-33. 2023

Introducción

Las lesiones inducidas por las radiaciones electromagnéticas (RE) y en particular, por aquellas radiaciones no ionizantes provenientes de los innumerables aparatos electrónicos de uso cotidiano, como por ejemplo los hornos microondas (Jones y col., 1987), han sido ampliamente descritos como una consecuencia del efecto térmico de tales radiaciones. Sin embargo, aquellas lesiones que son consecuencia del efecto no térmico continúan siendo un tema por explorar ya que, hasta donde se conoce, son pocos los modelos exitosos que aportan confiabilidad a los investigadores ante los efectos biológicos ocasionados (Lai y col., 2021). Esto ha incentivado a investigar más sobre la etiología de las lesiones producidas sobre la materia viva como consecuencia de la radiación de microondas. Su interacción con ésta, desencadena una serie de daños que ponen en peligro la salud humana; afectando, tanto la estructura como la función de órganos vitales como el cerebro y el corazón, entre otros (Stam, 2022). En tal sentido la búsqueda de nuevos modelos animales de experimentación, convencionales o no, para profundizar sobre el conocimiento de dichas lesiones, resulta prioritario. A nivel clínico, algunos efectos fisiológicos como la fatiga, la disminución de la capacidad de aprendizaje y el deterioro cognitivo, han sido reportados como lesiones de naturaleza no térmica de las microondas (Wang y col., 2015). A nivel experimental, los estudios *in vivo* con modelos animales convencionales como la rata, el ratón, el conejo, entre otros, han sido ampliamente utilizados para estudiar los efectos de la radiación de microondas sobre la actividad locomotora (Wang y col., 2015; Van Eeghem, 2017; Kim y col., 2019). También han sido de gran utilidad

para evaluar los efectos biológicos de la radiación de microondas de baja frecuencia sobre la función cognitiva (Deshmukh y col., 2015; Pall, 2016; Shahin y col., 2018; Kim y col., 2019). A pesar de tales conocimientos, los efectos no térmicos de los campos electromagnéticos continúan siendo controversiales. A ello también se le ha sumado que, hoy día los altos costos para la obtención y el mantenimiento de estos animales convencionales, así como las bien conocidas restricciones bioéticas, han limitado su uso en las investigaciones de los efectos colaterales de las RE. Todas estas limitaciones antes mencionadas, han abierto la posibilidad de buscar otros modelos no convencionales de menor costo, de más fácil adquisición y sobre todo modelos animales *in vivo* que cuentan con propiedades fisiológicas fácilmente medibles y cuantificables. En tal sentido, en la presente investigación hemos hecho uso de la etapa larvaria L4 del mosquito *Aedes aegypti*, como un modelo de experimentación *in vivo* no convencional alternativo (Álvarez y col., 2021a,b), para evaluar las lesiones inducidas por la radiación de microondas, estableciendo la temporalidad de los efectos a través de la relación tiempo-temperatura-lesión inducida y conociendo la frecuencia de la fuente de emisión así como la densidad promedio de la potencia incidente de las radiaciones.

Materiales y Métodos

MODELO LARVARIO *IN VIVO*. TIEMPO-TEMPERATURA LETAL MEDIA. T_{L50}

La etapa larvaria *in vivo* del mosquito *Aedes aegypti*, ha sido propuesta de acuerdo con el protocolo de experimentación,

previamente diseñado en nuestro laboratorio y definido como un modelo integral no convencional denominado *Aa-global-Tox* (Álvarez y col., 2022). La población larvaria de estadio L4, fue obtenida al azar del larvario del laboratorio y fueron distribuidas como grupos individuales en pozos cóncavos de 4 mm³ a razón de 10 larvas/pozo, en un volumen final de 1 mL de solución acuosa del medio larvario. Para el tratamiento, fue utilizado un horno microonda casero, de radiación no ionizante, con una fuente de radiación de 2450 MHz y una densidad de potencia promedio de 5 mV/cm². Las poblaciones larvarias/pozo, fueron categorizadas como población P1, P2, P3, P4, P5 y P6, y sometidas a tiempos de exposición de 1, 3, 6, 9, 12 y 15 segundos (s), respectivamente; tiempos estos definidos a partir de la escala de pulsos del microondas, particularmente: 59 (1s), 57 (3s), 54 (6s), 51 (9s), 48 (12s) y 45 (15s). Para cada condición de tratamiento, se midió la temperatura con el apoyo de un termómetro Berracom de tecnología digital con resolución de 0.1°C. Los efectos de la radiación en función del tiempo de exposición nos permitieron establecer la relación Tiempo-temperatura-Letal media o $T_T L_{50}$, con sus niveles de supra y sub, $T_T L_{50}+$ y $T_T L_{50}-$, respectivamente. La observación simple y directa, nos permitió establecer el porcentaje de mortalidad larvaria a través de visualizar la presencia de lesiones generalizadas sobre la estructura tegumentaria corporal, la ausencia de la actividad cardiaca y la presencia o no de parálisis de la actividad motora. En la población larvaria sobreviviente y en condición de sub-letalidad, las lesiones generalizadas fueron analizadas con el uso del colorante Vital Azul de Toluidina (AT); un colorante con metacromasia dependiente

de la carga iónica de los tejidos (Sridharan y Shankar, 2012). Para ello, las larvas fueron incubadas *in vivo*, en una solución de AT 05% en agua desionizada durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo, fue removido el exceso del colorante con dos lavados en agua desionizada para ser luego observadas al microscopio. Bajo el microscopio de contraste de fase se realizaron registros fotográficos que fueron procesados con la plataforma del programa de análisis de la imagen ImageJ Fiji, haciendo uso de la segmentación de imagen y la expresión de densidad colorimétrica.

CONDUCTA DE NADO. ACTIVIDAD MOTORA (AM)

Bajo la misma condición de sub-letalidad, se procedió a cuantificar la AM, como lesión subletal. Para ello, se procedió a realizar videos cortos de 30 segundos, a una velocidad de 15 cuadros/segundos, para analizar el perfil de la actividad motora de las respectivas poblaciones larvarias, pre y post tratamiento. Dicha actividad fue referida a los movimientos zigzagueantes y cóncavo-convexo de las larvas. El análisis de los respectivos videos fue realizado con el programa Video Tracker (Conklin y col, 2015), que permitió generar un Tacograma de picos representativos de la frecuencia de movimientos oscilatorios (fmo), en función del tiempo (s), lo cual se tradujo en la velocidad angular (ω), considerada como: $\omega = 2\pi \cdot f$ (rad/s). La relación de Sensibilidad/Especificidad de la variación de la velocidad angular se usó para determinar el índice de variabilidad de la actividad motora (Iv-AM), a través de la estimación del Área Bajo la Curva (ABC) de dicha relación con el apoyo del programa GraphPad Prism.

ACTIVIDAD CARDIACA CONTRACTIL (ACC)

Bajo la misma condición de subletalidad, se procedió a cuantificar la Actividad Cardíaca Contráctil (ACC), también como lesión subletal. Para ello, se procedió a realizar videos cortos de 30 segundos a una velocidad de 15 cuadros/segundos, sobre la región cardíaca larvaria, ubicada en la porción abdominal al nivel medial de los denominados troncos traqueales longitudinales (Andereck y col., 2010). Para el video análisis, fue utilizado el mismo programa de análisis Tracker, recreando en el software la dinámica de una partícula en movimiento oscilatorio. El programa generó un Tacograma de la frecuencia promedio de los picos sistólicos y diastólicos de la contracción (fpc), en función del tiempo (s). Dicha frecuencia se utilizó para estimar la variabilidad de dicha frecuencia en términos del valor de la distancia entre los picos de contracción (c-c), equivalente al valor del segmento R-R de un electrocardiograma. La relación de Sensibilidad/Especificidad de los valores de variación del segmento c-c, fue usado para determinar el índice de variabilidad de la frecuencia cardíaca de contracción (Iv-ACC), a través de la estimación del Área Bajo la Curva (ABC), de dicha relación, con el apoyo del programa GraphPad Prism. Como garantía de que las respuestas emitidas por la población larvaria de *Aedes aegypti*, ante la acción de las microondas electromagnéticas, no eran debidas a un proceso casual sino consecuencia directa de la radiación, se compararon los índices Iv-AM y Iv-ACC, con los respectivos índices obtenidos para el cloruro de potasio (KCl), un agente usado con patrón tóxico sugerido por otros autores (Sánchez-Bain y col., 2004; Castañedo y col., 2019).

Análisis estadístico

Los valores medios, pre y postratamiento, de la cuantificación de las variables de las lesiones evaluadas, fueron analizados mediante la prueba no pareada, y considerados de manera independiente o no relacionado para determinar así las posibles diferencias significativas entre los valores pre y postratamiento. Se considero como significativo un valor de $p < 0,05$. También fue utilizado el estadístico aportado por el Área Bajo la Curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic), para establecer los posibles índices de variabilidad de los respectivos parámetros. Esto fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism.

Resultados

El protocolo de modelo *in vivo* para larvas de *Aedes aegypti*, permitió evaluar las variaciones de temperatura durante los distintos tiempos de exposición a las radiaciones microondas (Figura 1a). Así, se pudo determinar que, entre 1 y 3 segundos de exposición, los pozos contentivos de las poblaciones P1 y P2, no presentaron cambio significativo de la temperatura del medio, expresada entre $22,18 \pm 0,07^\circ\text{C}$ y $22,20 \pm 0,01^\circ\text{C}$. Sin embargo, los pozos contentivos de las poblaciones P3, P4, P5 y P6, los cuales fueron sometidos a mayores tiempos de exposición: 6, 9, 12 y 15 segundos, experimentaron una elevación significativa de la temperatura, incremento expresado entre $31,14 \pm 1,4$, $41,48 \pm 1,8$, $48,24 \pm 4,5$ y $51,57 \pm 2,1^\circ\text{C}$, respectivamente (Figura 1b). Las lesiones generalizadas resultaron evidentes a través de severas señales de quemadura, visibles por el

ennegrecimiento del tejido tegumentario superficial en la población larvaria expuestas a mayores tiempos de tratamiento (Figura 1c). Solo en las poblaciones P1 y P2, hubo presencia de señales de sobrevivencia, con actividad motora y con actividad cardiaca, medible y cuantificable. Al establecer la relación entre las lesiones causadas por la radiación y los tiempos de exposición, se pudo determinar una relación Tiempo-temperatura-dependiente, a mayor tiempo de exposición a las radiaciones microondas mayor mortalidad (Figura 2a). Al realizar la transformación logarítmica de la relación mortalidad y tiempo, se pudo obtener el Tiempo-temperatura letal media o $T_{TL_{50}}$ de 6,3 segundos,

con un IC.95% entre 3,1 y 12 segundos (Figura 2b). Cabe destacar que el patrón tóxico de KCl presento una $CL_{50}=48,62$ mM, así como el $Iv-am=62,18\pm 3,7\%$ en intervalo de confianza IC.95% 54,80 a 69,56 y el $Iv-aac=55,23\pm 1,78\%$ en un intervalo de confianza IC.95% 51,78 a 58,68%. La tinción con AT en las larvas con señales de sobrevivencia, mostraron metacromasia del colorante vital a nivel del tejido tegumentario superficial. Su cuantificación histomorfométrica mostró un viraje de coloración en los controles de color azulado con intensidad concentrada en puntos bien delimitados, hacia un color de tonalidad verdosa de igual intensidad sin embargo de una distribución difusa, en

los tratados (Figura 3a). El mencionado viraje quedo representado en términos del desplazamiento del histograma hacia la derecha (Figura 3b).

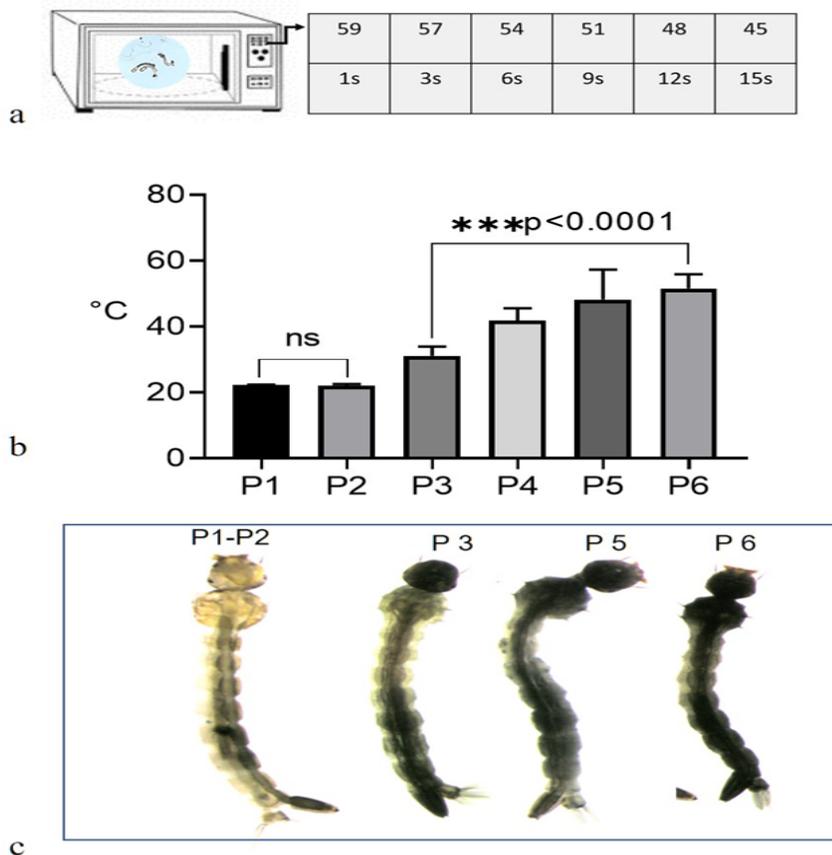


Figura 1. a) Fuente de radiación microondas y los distintos tiempos de exposición de acuerdo con la escala de pulsos descritos para el instrumento, b) representación gráfica del incremento de temperatura en las poblaciones larvarias sometidas a distintos tiempos de exposición, c) lesiones generalizadas en la población sobreviviente P1 y p2 y lesiones letales, quemaduras en las poblaciones a mayor tiempo de exposición

CONDUCTA DE NADO. ACTIVIDAD MOTORA (AM)

La AM de las poblaciones larvarias P1 y P2, sobreviviente al tratamiento (post) en el rango de tiempo subletal (TL_{50}^-), medido en términos de la velocidad angular, presentó, un Tacograma con una evidente disminución de los picos de angulación que describen la reducción significativa del desplazamiento y de los movimientos zigzagueantes de la población larvaria (Figuras

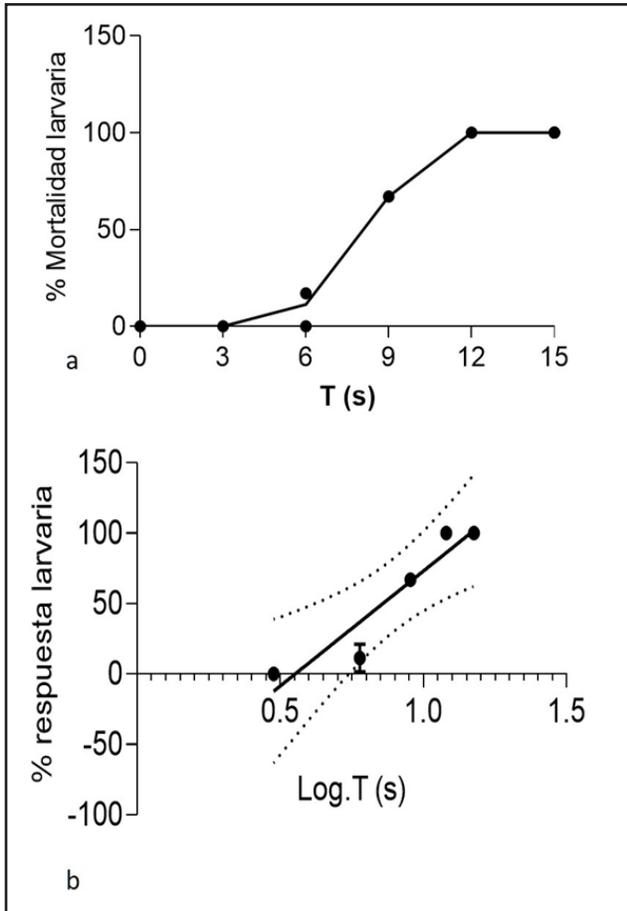


Figura 2. a) Curva sigmoidea, % de mortalidad y tiempo de exposición y b) transformación logarítmica y obtención de $T_{L_{50}}$ de 6,3 segundos, con un IC.95% entre 3.1 y 12 segundos

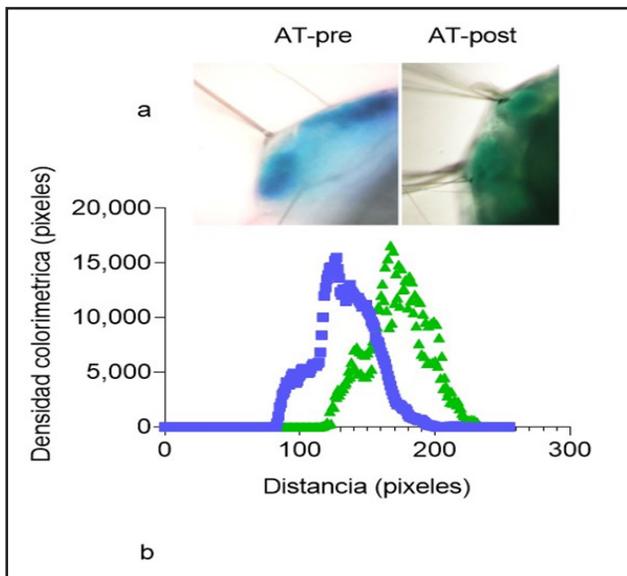


Figura 3. a) Metacromasia del colorante vital AT a nivel del tejido tegumentario superficial con viraje del color azulado concentrado en puntos bien delimitados condición control y en $T_{L_{50}}$ - y b) cuantificación por histomorfometría

4a y 4b), lo que se tradujo en una reducción significativa de la velocidad angular desde $142,7 \pm 6,3$ rad/s a $68,94 \pm 1,22$ rad/s (Figura 4c), con una pérdida significativa ($****p < 0,0001$) del 51,68% de la AM (Figura 4c). La relación Sensibilidad/Especificidad del ensayo permitió definir un índice de variabilidad de la actividad motora (Iv-AM) de $62,21 \pm 1,8$ rad/s dentro de un IC95% entre 58,54 a 65,89 $p < 0,0001$ (Figura 4d).

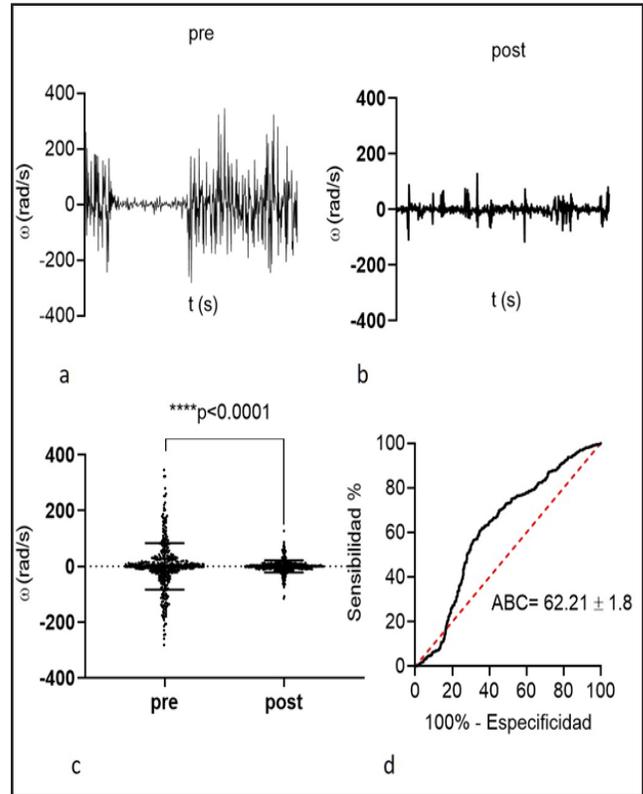


Figura 4. a) Tacograma de la velocidad angular previo al tratamiento y bajo la acción del $T_{L_{50}}$ -, se destaca la reducción de las espigas de angulación, c) representación gráfica cuantitativa de la pérdida significativa de velocidad angular, d) índice de variabilidad de la actividad motora, Iv-AM, equivalente al área bajo la curva (ABC) de la representación gráfica de sensibilidad/especificidad

ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL (ACC)

La ACC de las poblaciones larvarias P1 y P2, sobrevivientes al tratamiento (post) en el rango de tiempo subletal (TL_{50} -), medida en términos de la frecuencia de los picos de contracción sistólica y diastólica, presento

un Tacograma con una evidente disminución de dichos picos (Figuras 5a y 5b), lo que se tradujo en una reducción significativa desde $72,25 \pm 3,09$ c/s a $34,50 \pm 1,2$ c/s, con una pérdida significativa del 52,25% de ACC ($p=0,0038$). Dicha disminución en la frecuencia de contracción estuvo acompañada de un incremento en la amplitud sistólica y un alargamiento en el intervalo c-c, lo que permitió determinar la variabilidad de la frecuencia de contracción cardíaca sistólica con un incremento en la longitud del intervalo c-c; de 1,2 ms a 1,50 ms (Figura 5c), con una diferencia entre las medias de $0,2 \pm 0,007$ ms, en un intervalo de confianza entre 0,12 a 0,43 ms. La relación Sensibilidad/Especificidad, permitió definir un índice de variabilidad de la frecuencia promedio de ACC (Iv-ACC), de $62,40 \pm 4,7$ dentro de un IC95% de 53 a 71 y $p=0,01$ (Figura 5d).

Discusión

Los resultados demuestran que, efectivamente, las RE y particularmente las microondas no ionizantes, al interactuar con la materia viva, en este caso con un organismo *in vivo* como la larva del mosquito *Aedes aegypti*, desencadenan una serie de lesiones que pudieron ser diferenciadas como lesiones de naturaleza térmica y no térmica, como ha sido propuesto por otros autores en otros modelos orgánicos (De la Hoz y col., 2015). Las primeras de ellas, puestas en evidencia a través del alto porcentaje de mortalidad y los intensos signos de quemadura presentados sobre el epitelio tegumentario del cuerpo larvario, y las segundas caracterizadas como lesiones subletales, puestas en evidencia a través de los significativos cambios en la actividad motora (AM) y de la actividad cardíaca contráctil (ACC). Como es sabido, las microondas no ionizantes carecen de la energía suficiente para poder desencadenar el proceso de ionización sobre componentes moleculares de la materia viva, sin embargo, son capaces de generar calentamiento; una característica interpretada como un proceso de "calentamiento dieléctrico", definido, por algunos autores, como la consecuencia de lesiones mecánicas ejercida por las microondas sobre los tejidos (Ji y Brace, 2011). Dicho fenómeno ha sido vinculado con el proceso conocido en tiempos pasados como el "síndrome de microondas", una condición clínica caracterizada por un amplio espectro de lesiones multisistémicas que generalmente han sido reportadas por individuos expuestos a un medio ambiente, altamente contaminado por campos electromagnéticos (Stein y Udasin, 2020; Omer, 2021; Mumtaz y col., 2022). Ahora bien, dentro de nuestra experimentación no contamos con elementos para poner

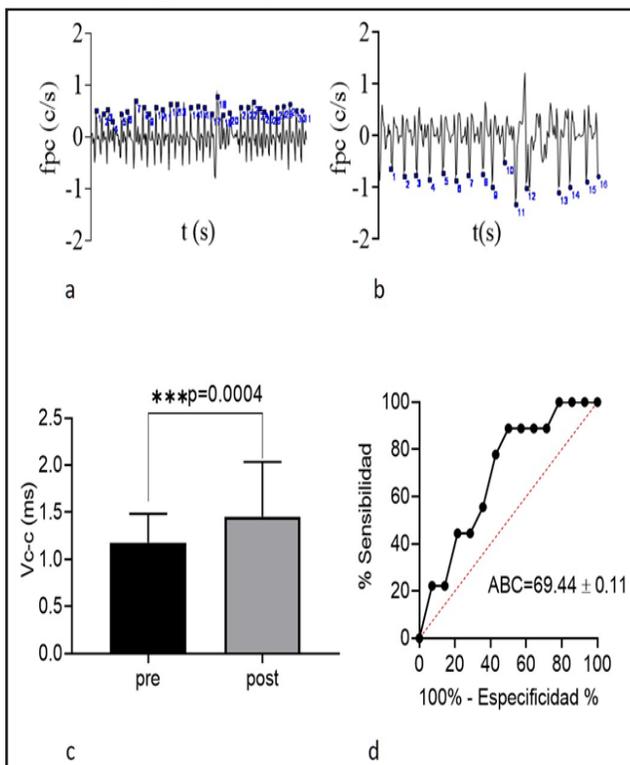


Figura 5. a) Tacograma de la frecuencia promedio de contracción previo al tratamiento y b) bajo la acción del T_{R50-} , se destaca el incremento del segmento c-c, c) representación gráfica cuantitativa de la variabilidad del segmento c-c y d) índice de la variabilidad de la actividad cardíaca contráctil, Iv-ACC, equivalente al área bajo la curva (ABC) de la representación gráfica de sensibilidad/especificidad

en evidencia dicho proceso, sin embargo, ha sido claro que la población larvaria de *Aedes aegypti*, resultó sensible a las radiaciones microondas y además de una manera tiempo-temperatura-dependiente. Por tanto, se hace factible interpretar que los resultados obtenidos pudieron estar signados por una acción supra umbral del proceso de "calentamiento dieléctrico", con lesiones ubicadas en el rango $T_{TL_{50}+}$ y una acción sub-umbral de dicho proceso, con lesiones ubicadas en el rango $T_{TL_{50}-}$. Así que, las lesiones de naturaleza térmica quedarían circunscritas dentro del espacio de "supra calentamiento dieléctrico", y las lesiones de naturaleza no térmica quedarían circunscritas dentro del espacio de "sub calentamiento dieléctrico". Ahora bien, ante el hecho de que las lesiones letales resultaron evidentes, surge la pregunta: ¿qué decir de las lesiones de naturaleza no térmica descritas con nuestros resultados? Al respecto cabe destacar que un área altamente vulnerable a la RE es el sistema nervioso central; una vulnerabilidad también reflejada a través de señales de daño en la funcionalidad del sistema cardiovascular (Sage, 2015; Roux y col., 2015). Dicha vulnerabilidad, ha sido definida como dependiente de la frecuencia de la radiación, ya que a un mayor tiempo de exposición se obtendría una mayor penetración de la radiación a través de la piel, lo que también definiría un menor o mayor daño tisular y también daño sobre las fibras nerviosas (Verma y col., 2021). Si bien no contamos con una medición del grado de absorción de la radiación utilizada, sí resultó evidente que hubo una alteración a nivel del área de las terminaciones nerviosas que conforman el sistema nervioso larvario, terminaciones ubicadas a nivel superficial del tejido tegumentario, como fue demostrado con el AT. Por tanto es

posible que haya ocurrido una alteración de los mecanorreceptores, encontrados en las estructuras anatómicas denominadas setas, con microvellosidades, ganglios y fibras nerviosas que constituyen la neuroanatomía de las larvas de *Aedes aegypti*, permitiendo así interpretar que los cambios en la AM y en la ACC registrados, sean el resultado de una acción sobre el tejido nervioso, de manera similar a la descrita por otros autores que han explorado la etiología de las lesiones inducidas por las RE, con lo cual podríamos estar contribuyendo con la constante revisión de los mecanismos subyacentes a la hipersensibilidad de los organismos vivos a las RE, en distintas condiciones de exposición que han sido analizadas por numerosos autores (Stein y Udasin, 2020; Wojtczak y Piotrowski, 2020; Vijayan y Eslick, 2022). Dichas lesiones estuvieron fortalecidas al comparar los índices de variabilidad de los parámetros AM y ACC, con los mismos índices obtenidos con el agente tóxico de referencia KCl, resultando por tanto evidente que la población larvaria de *Aedes aegypti*, experimentó un fenómeno de hipo e hipersensibilidad electromagnética dependiente del tiempo de exposición. Finalmente podemos concluir que, efectivamente, el modelo larvario L4 del mosquito *Aedes aegypti* resultó ser un modelo confiable de experimentación *in vivo* no convencional para evaluar las lesiones inducidas por la radiación de microondas, conociendo la frecuencia de la fuente de emisión, la densidad promedio de la potencia incidente y estableciendo la temporalidad de los efectos a través de la relación tiempo-temperatura-lesión inducida. Dichas lesiones pudieron ser diferenciadas, entre las de naturaleza térmica y no térmica, muy probablemente como consecuencia de un fenómeno diferencial de "calentamiento dieléctrico".

Queda abierto el desarrollar protocolos que permitan descifrar el o los posibles mecanismos celulares vinculados con dicho calentamiento, para lo cual se ha sugerido indagar sobre los posibles cambios a nivel de los neurotransmisores, así como a nivel del estado de la proteómica oxidativa, como ha sido sugerido para otros modelos de experimentación (Deshmukh y col., 2013; Shahin y col., 2018; Kim y col., 2019).

Agradecimientos

Al Biólogo Carlos Velásquez por sus oportunas opiniones durante el proceso de experimentación, así como al Sr. Danny Duran por su apoyo en la recolección y mantenimientos de la población larvaria del *Aedes aegypti*.

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses alrededor de la publicación que hemos decidido en mayoría, sea publicada.

Referencias Bibliográficas

Álvarez M, Hernández C, Barrios A. 2021a. Respuesta funcional y morfológica ante la luz UV emitida por larvas de *Aedes aegypti* tratadas bajo condiciones de oxidación avanzada: Un análisis morfométrico. RETEL, Revista de Toxicología en línea 46-64.

Álvarez M, Hernández C, Morales E, Hernández F, Velásquez V, Zuleta G. 2021b. Respuestas morfofuncionales de larvas de mosquito *Aedes aegypti* a la Tetrametrina-Real-ZZ®. Rev Toxicol 38: 34-38.

Álvarez M, Barrios A, Navarro E. 2022. Aa-Integral-Tox: un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes aegypti*: un modelo animal no convencional. Rev Fac Far 85(1-2):128-138.

Andereck JW, King JG, Hillyer JF. 2010. Contraction of the ventral abdomen potentiates extracardiac

retrograde hemolymph propulsion in the mosquito hemocoel. PloS One 5(9):e12943.

Castañedo ZA, Águila E, Marrero O, Meneses-Marcel A, Sifontes S, Seijo M, Santana A. 2019. Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia. Rev Toxicología 36 (2): 127-142.

Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Woods IG. 2015. Video hacking: automated tracking and quantification of locomotor behavior with open-source software and off-the-shelf video equipment. J Undergraduate Neuroscience Education 13(3): A120-A125.

De la Hoz A, Díaz-Ortiz A, Moreno A. 2005. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. Chem Soc Rev 34(2):164-78.

Deshmukh PS, Banerjee BD, Abegaonkar MP, Megha K, Ahmed RS, Tripathi AK, Mediratta PK. 2013. Effect of low-level microwave radiation exposure on cognitive function and oxidative stress in rats. Indian J Biochem Biophys 50(2):114-9.

Deshmukh PS, Nasare N, Megha K, Banerjee BD, Ahmed RS, Singh D, Abegaonkar MP, Tripathi AK, Mediratta PK. 2015. Cognitive impairment and neurogenotoxic effects in rats exposed to low-intensity microwave radiation. Int J Toxicol 34 (3): 284-90.

Ji Z, Brace CL. 2011. Expanded modeling of temperature-dependent dielectric properties for microwave thermal ablation. Physics Medicine Biology. 56(16): 5249-5264.

Jones LR, Taylor AW, Hines HC. 1987. Characteristics of frozen colostrum thawed in a microwave oven. J Dairy Sci 70(9):1941-1945.

Kim JH, Lee CH, Kim HG, Kim HR. 2019. Decreased dopamine in striatum and difficult locomotor recovery from MPTP insult after exposure to radiofrequency electromagnetic fields. Sci Rep 49 (1):1201.

Lai YF, Wang HY, Peng RY. 2021. Establishment of injury models in studies of biological effects induced by microwave radiation. Mil Med Res 1(1):12.

Mumtaz S, Rana J. N, Choi E. H, Han I. 2022. Microwave Radiation and the Brain: Mechanisms, Current Status, and Future Prospects. International J Molecular Sciences 23(16): 9288.

Omer H. 2021. Radiobiological effects and medical applications of non-ionizing radiation. Saudi J Biological Sciences 28(10):5585-5592.

Pall M. L. 2016. Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric

- effects including depression. *J Chemical Neuroanatomy* 75: 43-51.
- Roux D, Catrain A, Lallechere S, Joly JC. 2015. Sunflowers exposed to high-intensity microwave-frequency electromagnetic field: electrophysiological response requires a mechanical injury to initiate. *Plant Signal Behav* 10(1): e972787.
- Sage C. 2015. The implications of non-linear biological oscillations on human electrophysiology for electrohypersensitivity (EHS) and multiple chemical sensitivity (MCS). *Rev Environ Health* 30(4): 293-303.
- Sánchez-Bain A, Forget G, Feola G, Ronco A. 2004. En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, Inter calibración, resultados y aplicaciones*. IMTA: México, 2004. pp.127-140.
- Shahin S, Banerjee S, Swarup V, Singh SP, Chaturvedi CM. 2018. 2.45-GHz microwave radiation impairs hippocampal learning and spatial memory: Involvement of local stress mechanism-induced suppression of iGluR/ERK/CREB signaling. *Toxicol Sci* 161(2): 349-74.
- Sridharan G, Shankar AA. 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol* 16(2):251-255.
- Stam R. 2022. Occupational exposure to radiofrequency electromagnetic fields. *Ind Health*. 160 (3):201-215.
- Stein Y, Udasin IG. 2020. Electromagnetic hypersensitivity (EHS, microwave syndrome) - Review of mechanisms. *Environ Res* 186: 109445.
- Van Eeghem V, El Arfani A, Arta A, Walrave L, Pourkazemi A, Bentea E, Stiens J. 2017. Selective changes in locomotor activity in mice due to low-intensity microwave amplitude modulated in the EEG spectral domain. *Neuroscience* 359:40-48.
- Verma S, Keshri GK, Karmakar S, Mani KV, Chauhan S, Yadav A, Sharma M, Gupta A. 2021. Effects of Microwave 10 GHz Radiation Exposure in the Skin of Rats: An Insight on Molecular Responses. *Radiation Research* 196(4): 404-416.
- Vijayan, K, Eslick GD. 2022. A meta-analysis of the risk of salivary gland tumors associated with mobile phone use: the importance of correct exposure assessment. *Rev Environ Health* doi: 10.1515/reveh-2022-0055.
- Wang C, Wang X, Zhou H, Dong G, Guan X, Wang L, Xu X, Wang S, Chen P, Peng R, Hu X. 2015. Effects of pulsed 2.856 GHz microwave exposure on BM-MSCs isolated from C57BL/6 mice. *PLoS One* 10(2): e0117550.
- Wojtczak, M, Piotrowski Z. 2020. Radiation standards review concerning non-ionizing radiation. In: *Radio Electronic Systems Conference 2019*, Vol 11442. International Society for Optics and Photonics p. 114420J.



Desarrollo de geles masticables de ibuprofeno para pacientes pediátricos

Development of ibuprofen chewable gels for pediatric patients

REINALDO J ARISTIMUÑO^{*1}, OMAR G CARMONA², IVÁN A MOGNA³, LEXANDRA D OLIVAR⁴,
ADRIANA P RAMOS⁵, GREGORY J ROSAL⁶

Resumen

El desarrollo de geles masticables de ibuprofeno dirigidos a pacientes pediátricos en edad escolar supone retos tanto de investigación documental, como tecnológicos al momento de su manufactura. Se realizaron los estudios de preformulación y pruebas previas al principio activo, el ibuprofeno, y a los diferentes excipientes para lograr características que no comprometan la eficacia y seguridad del medicamento, ni la aceptabilidad por parte del paciente. La principal limitante de esta formulación es el sabor amargo del ibuprofeno. Para disminuirlo se recurrió al uso de las tecnologías que implican el enmascaramiento del sabor, tales como la incorporación de Ibuprofeno suspendido en la formulación, ya que el ibuprofeno suspendido retrasa la aparición del sabor amargo en comparación con el parcialmente disuelto. En segundo lugar, la supresión cognitiva central mediante la adición de sacarina como edulcorante que compite con las moléculas de ibuprofeno por las proteínas de las células receptoras; y finalmente la supresión periférica mediante la adición de gluconato de calcio y acetato de sodio. Los iones sodio y calcio modifican el receptor de sabor y disminuyen su afinidad por la molécula de ibuprofeno. Se aplicaron herramientas estadísticas, diseño factorial y diseño de experimentos con mezclas simplex centroide para delimitar el número de experimentos en base a las variables dependientes "sabor" y "consistencia" e independientes el porcentaje de acetato de sodio y gredina, respectivamente. Se obtuvo una matriz de cinco experimentos y se seleccionó el número dos como la "mejor fórmula". Se definió, en base a principios tecnológicos la técnica de manufactura ideal.

Palabras clave: Gel masticable, sabor amargo, ibuprofeno, paciente pediátrico

Abstract

The development of chewable ibuprofen directed to school-age pediatric patients requires both documentary research and technological challenges at the time of their manufacture. Preformulation studies and prior tests of the active principle, ibuprofen, and the different excipients were carried out to achieve characteristics that do not compromise the efficacy and safety of the drug, nor the acceptability by the patient. The main limitation of this formulation is the bitter taste of ibuprofen. To reduce it, the use of technologies involving taste masking was used, such as the incorporation of suspended ibuprofen in the formulation, since suspended ibuprofen delays the onset of a bitter taste compared to a partially dissolved one. Second, central cognitive suppression by adding saccharin as a sweetener that competes with ibuprofen molecules for receptor cell proteins; and finally peripheral suppression by adding calcium gluconate and sodium acetate. Sodium and calcium ions modify the taste receptor and decrease its affinity for the ibuprofen molecule. Statistical tools, factorial design, and design of experiments with centroid simplex mixtures were applied to delimit the number of experiments based on the dependent variables' "taste" and "consistency" and independent of the percentage of sodium acetate and gelatin, respectively. A matrix of five experiments was obtained and number two was selected as the "best formula". Based on technological principles, the ideal manufacturing technique was defined.

Keywords: Chewable gel, bitter taste, ibuprofen, pediatric patient

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia "Dr. Jesús María Bianco", Mención Tecnología Industrial.
Correspondencia: reinaldoaristi16@gmail.com.

Orcid: [10000-0002-9333-1516](https://orcid.org/0000-0002-9333-1516)

[50000-0002-5381-5882](https://orcid.org/0000-0002-5381-5882)

[20000-0003-3197-8610](https://orcid.org/0000-0003-3197-8610)

[60000-0001-9362-5648](https://orcid.org/0000-0001-9362-5648)

[30000-0003-2765-0487](https://orcid.org/0000-0003-2765-0487)

[40000-0002-5387-2801](https://orcid.org/0000-0002-5387-2801)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.5)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 25/04/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 34-43. 2023

Introducción

Durante las últimas décadas, el sector farmacéutico es uno de los rubros donde más se invierte en investigación y desarrollo (I+D) en el mundo (Castro Quesada, 1969). Por este motivo, la industria farmacéutica ha buscado siempre optimizar o adecuar el desarrollo de formulaciones farmacéuticas a ser administradas por vía oral. El uso de medicamentos por esta vía resulta ser una tarea complicada, y más cuando de niños se trata, a pesar de que esto resulte en un beneficio para la salud en dichos pacientes.

Los niños suelen ser menos tolerantes con los sabores y las texturas de los alimentos, ya que ante cualquier estímulo con algo desconocido o poco agradable, expresan desagrado y rechazo, complicando el consumo de dicho alimento nuevamente en un futuro, y que, en el caso de los medicamentos no es diferente. La forma farmacéutica en la cual se presenta el fármaco para su administración en este tipo de pacientes es de suma importancia, ya que de eso depende el éxito de la terapia y de que no se generen experiencias traumáticas para los niños en torno al uso de la medicación. La vía de administración de preferencia para este tipo de pacientes es la oral, idealmente jarabes y suspensiones para su fácil deglución, sin embargo, no es siempre posible debido a la idiosincrasia de algunos fármacos. En Estados Unidos de Norteamérica para el año 2001, de 41,000 ensayos clínicos controlados con medicamentos, solamente 200 correspondían a estudios que potencialmente podrían permitir el uso de nuevos fármacos en pacientes pediátricos. Esta realidad coloca a los niños en una posición de desventaja con relación a los adultos, haciendo más lenta

su posibilidad de acceso a terapias más modernas y efectivas, obligándolos a tomar presentaciones de medicamentos (tabletas, cápsulas, grageas) diseñadas para tratar a pacientes adultos, por lo que se dificulta la dosificación e ingesta por parte de los niños. Como consecuencia de lo anterior mencionado, en varios foros internacionales a los niños se les ha llamado "huérfanos terapéuticos" (Arguedas y Mohs, 2001).

El ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido propiónico, es una mezcla racémica de enantiómeros R y S que tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Este fármaco se administra por vía oral y se comercializa en la actualidad en varias formas farmacéuticas (suspensión, grageas, tabletas convencionales y de liberación controlada). Debido a su seguridad terapéutica, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó su uso como analgésico, antipirético y antiinflamatorio sin prescripción médica en el año 1984 (Barrios y col., 2019; Martindale. 2000: A. Wolters Kluwer Company., 2000; Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2001; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2000).

La principal limitante del ibuprofeno en las formulaciones, es su sabor amargo. Es por ello por lo que se planteó la posibilidad de desarrollar una formulación de geles masticables de ibuprofeno que cumplan con características organolépticas adecuadas, pH, tiempo de desintegración y control de peso. Con ello se pretende que estos geles masticables sean una alternativa cómoda y sencilla de administrar por los cuidadores de los pacientes que ayude a solventar las necesidades terapéuticas de la población pediátrica en Venezuela.

El principal reto para lograr dicho objetivo fue enmascarar el sabor amargo del principio activo, por lo que se optó por mantenerlo suspendido en la matriz de gelatina, donde adicionalmente se utilizaron técnicas de enmascaramiento, como lo son la supresión cognitiva central, mediante el empleo de edulcorantes no calóricos como la sacarina y la supresión periférica obtenida por el empleo de iones de calcio y sodio, que fueron aportados por el uso de gluconato de calcio y acetato de sodio, respectivamente (Villegas-Ruiz y col., 2010).

Es por lo expuesto que, el presente estudio tuvo como objetivo el desarrollar geles masticables de ibuprofeno dirigidos a pacientes pediátricos. Para ello, se procedió a la realización de la revisión bibliográfica y antecedentes de geles masticables de ibuprofeno, a realizar estudios de preformulación a los excipientes que serán utilizados tentativamente para la elaboración de los geles masticables, a efectuar pruebas preliminares para evaluar selección, comportamiento y proporción de excipientes a utilizar en los geles masticables, a determinar las variables dependientes e independientes para el tratamiento estadístico pertinente, a decodificar la matriz factorial para establecer una fórmula final cuali-cuantitativa para la formulación de geles masticables de ibuprofeno y a establecer la técnica de manufactura para los geles masticables de ibuprofeno.

Materiales y métodos

La investigación fue de tipo experimental, cuantitativa, prospectiva y longitudinal ya que se llevó a cabo con el fin de describir

y establecer los excipientes idóneos para la formulación de geles masticables de ibuprofeno dirigidos a pacientes pediátricos con una edad comprendida entre 5 y 7 años. Constó de tres etapas, la revisión bibliográfica, la parte experimental donde se realizaron las pruebas preliminares y fórmulas en base a un diseño factorial, y por último las conclusiones y recomendaciones en base a los resultados obtenidos en la parte experimental.

PRUEBAS PRELIMINARES

Las primeras pruebas se realizaron con la finalidad de determinar el peso promedio de los geles masticables con los moldes utilizados, se prepararon geles masticables empleando únicamente grenetina, glucosa y agua a diferentes concentraciones, a la formulación resultante se le procedió a determinar el peso a veinte unidades por separado y calcular el peso promedio. La formulación que presentó las mejores características, y fue la que se utilizó para determinar el peso promedio de los geles masticables, fue la que contenía las proporciones de los componentes de Grenetina 20%, Glucosa 20% y Agua 60%.

Posteriormente, se realizaron estudios con los diferentes excipientes a utilizar para obtener una consistencia adecuada de los geles masticables y un sabor agradable de los mismos a través de los métodos de supresión cognitiva central y supresión periférica mediante la incorporación de enmascarantes de sabor y edulcorantes.

Con estas pruebas preliminares se logró determinar las concentraciones a emplear de cada uno de los excipientes, exceptuando la grenetina y el acetato de sodio, los cuales serán incorporados en el diseño factorial, Tabla I.

Las concentraciones de los componentes a emplear en la formulación, así como las funciones de los mismos fueron:

- **Ibuprofeno:** principio activo al 11,56%, que representa 200 mg de ibuprofeno por cada gel masticable y que tiene acciones como antipirético, analgésico y antiinflamatorio.
- **Grenetina:** es agente de cuerpo, el cual brinda consistencia a la formulación, se determinará la concentración óptima en el diseño factorial (Lascurain, 2012).
- **Glucosa:** a una concentración de 20%, la cual otorga elasticidad a la formulación además de brindar un leve dulzor a la misma
- **Glicerina:** Es utilizado en una concentración de 10% y se emplea para levigar el principio activo y su sabor dulce ayuda a enmascarar el sabor amargo del ibuprofeno.
- **Gluconato de calcio:** es utilizado como agente enmascarante del sabor amargo empleado al 1%. Se utilizó una solución de gluconato de calcio al 10% (Lawless y col., 2013).
- **Sacarina:** edulcorante no calórico. Su sabor dulce ayuda a enmascarar el sabor amargo del principio activo. Se utilizó al 0,4% en la formulación.
- **Benzoato de sodio:** agente preservante empleado al 0,2%.
- **Acetato de sodio:** es un agente enmascarante del sabor, el cual determinará la concentración óptima en el diseño factorial.
- **Colorante hidrosoluble rojo:** colorante modificador de propiedades organolépticas, empleado al 0,04%.
- **Saborizante de cereza:** saborizante modificador de propiedades organolépticas utilizado al 0,3%.
- **Agua destilada:** se utilizó como vehículo de la formulación en cantidad suficiente para completar el cien por ciento de esta.

Tabla I.
Fórmula general

Fórmula general	
Componente	Porcentaje
Ibuprofeno	11,56%
Grenetina	Factor B
Glucosa	20%
Glicerina	10%
Solución de gluconato de calcio al 10%	10%
Sacarina	0,4%
Benzoato de sodio	0,2%
Acetato de sodio	Factor A
Colorante hidrosoluble rojo	0,04%
Saborizante de cereza	0,3%
Agua	cs

Fuente: Datos propios

DISEÑO FACTORIAL

Una vez culminadas las pruebas preliminares y determinadas las concentraciones de algunos de los excipientes, se procedió a realizar un diseño factorial en base a las concentraciones de grenetina y acetato de sodio, estableciendo estas como variables independientes correlacionadas con las variables

dependientes de consistencia/ tiempo de desintegración y sabor, respectivamente.

El diseño factorial contó con 2 niveles, es decir, un experimento donde los factores K solo puede tener dos niveles. También se utilizó un diseño de experimentos con mezclas Simplex Centroide, estableciendo un centroide que fue la concentración en donde se observaron mejores resultados en las pruebas preliminares (Fernández, 2020).

La optimización de la aceptabilidad sensorial es un paso importante en el desarrollo de nuevos productos, y para alcanzar este objetivo, el Diseño Simplex-Centroide de la Metodología de Superficie de Respuesta se ha aplicado con éxito en varias investigaciones (Ricce y col., 2013; Caipo y col., 2015), esta metodología permite la identificación de rangos de las variables que optimizan una respuesta mediante la obtención de una ecuación de respuesta que describe el comportamiento de las variables sin implicar la realización de un conjunto completo de experimentos (Siche y col., 2015; Siche y col., 2016).

El diseño factorial se fijó en base a la siguiente ecuación y se obtuvo como resultado el siguiente cuadro resumen:

Diseño factorial 2^2 , es decir, $2^2=4$ experimentos + 1 centroide = 5 experimentos.

Una vez realizados los cinco experimentos del diseño factorial, se determinó que los geles masticables que presentaban mejores características fueron los de la formulación número 2 (0,03% de acetato de sodio y 13,5% de grenetina), y en segundo lugar la formulación número 4 (0,03% de acetato de sodio y 16,5% de grenetina). A ambas

formulaciones se les realizaron pruebas de control de proceso y una encuesta para evaluar y comparar sus características organolépticas, Tabla II.

Tabla II.

Experimento y concentraciones en base al diseño factorial

Experimento	Acetato de sodio	Grenetina
1	0,01	13,5
2	0,03	13,5
3	0,01	16,5
4	0,03	16,5
5	0,02	15

Fuente: Datos propios

CONTROLES EN PROCESOS

En la USP 42 (Davydova, 2018), se describen los siguientes ensayos con sus respectivos criterios de aceptación para los geles masticables:

- Determinación de pH: el valor de pH de la solución debe encontrarse en el rango de mayor estabilidad, que en el caso del ibuprofeno es de 6.
- Uniformidad de peso: ninguna de las 20 unidades pesadas debe estar 10% por encima o por debajo del peso promedio.
- Tiempo de desintegración: los 6 geles masticables colocados en cada una de las cestas del equipo deben desintegrarse en un tiempo no mayor a 15 minutos.

Resultados

Los controles en procesos de fabricación de los geles masticables que se realizaron fueron la determinación de pH, uniformidad

de peso, tiempo de desintegración y propiedades organolépticas.

Determinación de pH. Se realizaron 3 ensayos de medición de pH, y se utilizó un gel masticable por cada ensayo, también se utilizó agua desmineralizada a temperatura ambiente (Tabla III). Como se observa el pH promedio fue de 5,21.

Tabla III.
Resultados de pH de los geles masticables

N° del ensayo	pH
1	5,20
2	5,22
3	5,21
Promedio del pH	5,21

Fuente: Datos propios

Uniformidad de peso. En la Tabla IV se indican los datos obtenidos para 20 unidades de geles masticables, para un gel masticable preliminar del 1,7300g del cual se calculó el 10% del criterio de aceptación y da un rango de (1,557 - 1,903) g, siendo el peso promedio de 1,6740 g.

Tiempo de desintegración. Se realizaron 3 ensayos de desintegración con 6 unidades para cada ensayo, agua desmineralizada a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Tabla V). El tiempo promedio de desintegración fue de 1,05 minutos.

Para hacer una evaluación comparativa de las propiedades organolépticas de la mejor formulación se optó por utilizar el segundo mejor resultado obtenido por el sistema factorial, ya que en el mercado nacional no se dispone de ibuprofeno en presentación de gel masticable. Para efectuar dicha comparación se procedió a realizar una encuesta donde los participantes fueron voluntarios que declararon no ser alérgicos al ibuprofeno y tenían una edad comprendida entre 20 - 50 años. Se

Tabla IV.
Control de peso de los geles masticables

Unidad de gel masticable	Peso por unidad (g)	Variación con respecto al promedio (%)
1	1,6797	2,91
2	1,6681	3,58
3	1,6643	3,80
4	1,6580	4,16
5	1,6802	2,88
6	1,6459	4,86
7	1,6287	5,86
8	1,6914	2,23
9	1,6721	3,35
10	1,7012	1,66
11	1,6979	1,86
12	1,7041	1,50
13	1,6614	3,96
14	1,6715	3,38
15	1,6660	3,70
16	1,6742	3,22
17	1,6643	3,80
18	1,6752	3,17
19	1,6833	2,70
20	1,6933	2,12
Peso promedio	1,6740	

Fuente: Datos propios

Tabla V.
Resultados del tiempo de desintegración de los geles masticables

N° del ensayo	Tiempo de desintegración (min)
1	1,03
2	1,03
3	1,08
Promedio de tiempo de desintegración	1,05

Fuente: Datos propios

evaluaron ciertos aspectos como color, olor, consistencia, textura y sabor, haciendo énfasis en este último.

Discusión

La fiebre en pacientes pediátricos es uno de los motivos más frecuentes de derivación al pediatra y uso de medicamentos (Serwint y col., 2006). Las guías recomiendan el tratamiento de los niños febriles en el hogar a menos que exista la presencia de un problema subyacente grave. En las guías actuales se recomienda paracetamol o ibuprofeno para el tratamiento médico de la fiebre (Wong y col., 2014, Chiappini y col., 2013). Según los pediatras, el buen sabor de un fármaco y la facilidad para tragarlo, marcan la diferencia entre el éxito y el fracaso en el tratamiento (Winzenburg, 2009).

Uno de los mayores obstáculos para completar el tratamiento en el 90% de los pacientes pediátricos es el sabor desagradable (Walsh y col., 2014), por ello prescribir a los niños un antipirético agradable al paladar disminuirá las dificultades experimentadas por sus padres y aumentará el cumplimiento del medicamento por parte del paciente.

El presente estudio tuvo como objetivo el desarrollar geles masticables de ibuprofeno dirigidos a pacientes pediátricos. Nuestros resultados demuestran que la formulación 2 presentó un peso promedio de 1,6740 g, el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación, aunado que ninguno de los valores obtenidos supera el 10% permitido para aprobar el ensayo. Se asume que todos los geles masticables tienen la cantidad de principio activo que se declara en el producto final, cumpliendo con los estándares de peso para este producto farmacéutico. Por su parte, el promedio del pH obtenido de la formulación 2 fue de 5,21. Considerando que el pH de estabilidad del ibuprofeno es de 6, el valor promedio de

pH obtenido se considera cercano a su pH de estabilidad. Se asume entonces que el ibuprofeno está en un medio estable y no compromete la estabilidad ni eficacia de la formulación. El tiempo de desintegración de la formulación 2, en medio acuoso a 37°C, fue de 1,05 minutos. Es importante resaltar que para este trabajo se utilizó el criterio de Tiempo de desintegración de tabletas debido a que no existe en la USP 42 un criterio de aceptación para el tiempo de desintegración de geles masticables.

En relación con las propiedades organolépticas, en la presente formulación no fue posible eliminar por completo el sabor amargo que genera el ibuprofeno, sin embargo, se pudo atenuar de manera considerable dicho sabor con el uso de edulcorantes no calóricos y iones como el calcio y sodio. Nuestros hallazgos muestran que la formulación presentó un color rojo uniforme y nítido el cual hace alusión a la cereza. Mientras que la textura presenta un aspecto firme y flexibilidad moderada ideal para masticar y deglutir.

La formulación presentó una concentración de Ibuprofeno, como principio activo al 11,56%, que representa 200 mg de ibuprofeno por cada gel masticable y que tiene acciones como antipirético, analgésico y antiinflamatorio. La concentración es superior a la reportada por Paz Martín-Viaña y col. (2009) quienes desarrollaron la formulación de suspensión oral de ibuprofeno 100 mg/5mL para uso pediátrico; la cual cumple con los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y toxicológicos exigidos para una suspensión farmacéutica de uso en humanos, y resulta estable por un período de 24 meses, bajo las condiciones de almacenamiento y envase en que ha sido ensayado.

Al evaluar la encuesta se encontró que los voluntarios que participaron escogieron la formulación número 2 como aquella que presenta las mejores propiedades organolépticas, sin embargo, indicaron que existía un sabor amargo en la forma de dosificación que seleccionaron como la mejor. Al respecto, Aksöz y col. (2019) en un estudio para determinar los preparados de paracetamol e ibuprofeno preferidos en cuanto a sabor y olfato en el tratamiento de niños de forma ambulatoria y demostraron que todas las preparaciones de paracetamol e ibuprofeno son generalmente aceptables en cuanto a su sabor y olor. Sin embargo, prescribir a los niños un antipirético agradable al paladar disminuirá las dificultades experimentadas por sus padres y aumentará el cumplimiento del medicamento por parte del paciente.

Conclusiones

Para la formulación de geles masticables como forma farmacéutica no se requieren equipos ni recursos vanguardistas, sin embargo, uno de los mayores retos es lograr enmascarar los sabores desagradables de la mayoría de los principios activos, por lo que se procede a incorporar en la formulación edulcorantes no calóricos, saborizantes y enmascarantes. En este caso, el ibuprofeno presenta un sabor amargo característico, por lo cual se recurrió a la supresión cognitiva central y la supresión periférica como técnicas de enmascaramiento mediante la incorporación de sacarina, saborizante de cereza, gluconato de calcio y acetato de sodio para lograr enmascarar dicho sabor. No obstante, a pesar de que se logró disminuir la intensidad en la percepción de este, no se logró eliminar por completo el sabor amargo y picor que

deja el ibuprofeno al momento de deglutir el gel masticable, por ello, dentro de nuestras recomendaciones, se menciona utilizar un ibuprofeno recubierto, así como el empleo de otro edulcorante que permitan enmascarar mejor el sabor del principio activo.

Recomendaciones

La formulación que resultó de esta investigación tiene varios aspectos que, de mejorarse, modificaría el nivel de calidad y posiblemente la aceptación por parte de los pacientes de la formulación final:

1. Emplear un ibuprofeno modificado, es decir un ibuprofeno recubierto que podría permitir un mejor enmascaramiento del sabor debido a que se disminuye la velocidad de disolución del principio activo evitando el mal sabor y molestia en la garganta.
2. Emplear edulcorantes no calóricos o nutritivos (ENN) que estén permitidos en niños: existe un consenso con respecto al uso de ENN en pacientes pediátricos y un interés por parte de la comunidad pediátrica en la investigación para evaluar la seguridad y posible uso de estos aditivos en niños sanos y en algunas patologías. Entre los ENN aprobados para el consumo humano como aditivo alimentario la FDA ha aprobado dos edulcorantes no calóricos para su uso en niños: el advantame y el extracto de la fruta Luo han guo (monk fruit), sin embargo, no ha prohibido ni restringido el resto.
3. Proponer ante un Comité de Ética una prueba de sabor en niños: aunque la formulación está dirigida a pacientes pediátricos en una edad escolar (6

años), las pruebas de sabor y demás propiedades organolépticas fueron realizadas por un grupo de personas de edades comprendidas entre 20-50 años, esto es debido a que por razones éticas no se debe exponer a niños a una investigación sin que antes exista una aprobación de dicha investigación por un Comité de Ética que vele por la dignidad e integridad de los pacientes pediátricos.

4. Pruebas de estabilidad de la formulación: para realizar un estudio completo de los geles masticables de ibuprofeno se recomienda realizar ensayos de estabilidad acelerado y de estabilidad natural. Esto con la finalidad de determinar el tiempo de vida útil de esta formulación.
5. Evaluar sistemas envase-cierre: el sistema envase-cierre tiene la finalidad de proteger la forma farmacéutica y de asegurar la integridad de ésta última, por esta razón la elección del mismo es un factor muy importante a considerar al momento del desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas. Se recomienda como envase primario un blíster de cloruro de polivinilo (PVC) con la forma del gel masticable sellado con una lámina de aluminio debido a que evita el contacto entre los geles masticables previniendo la adhesión entre ellos, además este material es una excelente barrera contra el agua y oxígeno.

Referencias

- Aksöz E, Yazıcı S, Korkut O, Yılmaz N, Çelik T. 2019. A taste preference study in pediatric patients: Paracetamol and ibuprofen. *İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi* 9(1):10-16.
- Arguedas Arguedas O, Mohs Villalta E. 2001. La nueva Regla Pediátrica y los ensayos clínicos controlados. *Acta Médica Costarricense* 43(1): 03-04.
- Barrios L, Correa A, Gomendio S, Machado A. 2019. Ibuprofeno: ¿fármaco seguro?. *Salud Mil* 38(1):46-55.
- Caipo Y, Gutiérrez A, Julca A. 2015. Optimization by mixtures design of the acceptability of an energy bar from quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*) and cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) evaluated in children. *Agroindustrial Science* 5(1), 61-67.
- Castro Quesada C. 1969. Investigación Y Desarrollo (I+D) y La Dependencia Económica. *Revista Nacional de Administración* 2(1):125-34.
- Chiappini E, D'Elisio S, Mazzantini R, Becherucci P, Pierattelli M, Galli L, de Maritoni M. 2013. Adherence among Italian paediatricians to the Italian guidelines for the management of fever in children: a cross-sectional survey. *BMC Pediatr* 13:210.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2000. Catálogo Especialidades Farmacéuticas. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; p.1577-9.
- Davydova N. 2018. USP Dietary Supplements Stakeholder Forum. USP Chewable Gels Monographs Disponible en: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/stakeholder-forum/chewable-gels.pdf>.
- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 47 ed. Lima: Ediciones PLM; 2001. p. 1715-6.
- Fernández S. 2020. Tesis de maestría. Diseño de experimentos: Diseño factorial. Universidad Politécnica de Cataluña. España. <https://doi.org/10.1002/ebch.1978>.
- Lascurain G. 2012. Grenetina: proteína clave de la buena salud. *Vida sana*. Disponible en: <https://finance.yahoo.com/blogs/vida-sana/grenetina-proteina-clave-la-buena-salud-192324274.html>.
- Lawless HT, Rapacki F, Horne J, Hayes A. 2013. The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications. *Food Quality and Preference* 14(4):319-25.
- Martindale. The complete drug reference. 32 ed. London: Staff; 2000. p. 90.
- Paz Martín-Viaña N, Morales Lacarrere IG, Gil Apán JM, Casanave Guanaluze D, Barzaga Fernández P, Núñez Gomero R. 2009. Desarrollo de la formulación de la suspensión oral de ibuprofeno 100 mg/5 mL para uso pediátrico. *Revista*

- Cubana de Farmacia 43(2):1-11.
- Ricce C, Leyva M, Medina I, Miranda J, Saldarriaga L, Rodriguez J, Siche R. 2013. Using waste of La Libertad agroindustry in developing a bread. *Agroindustrial Scienc* 3(1), 41-4.
- Serwint JR, Thoma K, Dabrow SM, Hunt LE, Barratt MS, Shope TR, Darden PM, CORNET Investigators. 2006. Comparing patients seen in pediatric resi-dent continuity clinics and national ambulatory medical care survey practices: a study from the continuity research net-work. *Pediatrics* 118:e849-58.
- Siche R, Arteaga H, Saldaña E, Vieira FS. 2016. Antioxidant Capacity of Binary and Ternary Mixtures of Orange, Grape, and Starfruit Juices. *Current Nutrition & Food Science* 12(1):65-71.
- Siche R, Falguera V, Ibarz A. 2015. Use of response surface methodology to describe the combined effect of temperature and fiber on the rheological properties of orange juice. *J Texture Studies* 46(2):67-73.
- Villegas-Ruiz X, Ruiz-Espinosa H, Bárcenas-Pozo ME. 2010. Tecnologías de enmascaramiento de sabor amargo en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(1):27-36.
- Walsh J, Cram A, Woertz K, Breitzkreutz J, Winzenburg G, Turner R, Tuleu R, European Formulation Initiative. 2014. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: Do not forget the excipients. *Adv Drug Deliv Rev* 73:14-33.
- Winzenburg G Desset-Brethes S. 2009. Industry perspective on palatability testing in children-two case studies. *International J Pharmaceutics* 435(2):139-42.
- Wolters Kluwer Company A. *Drugs Facts and Comparisons*. 54 ed. St Louis: Facts and Comparisons; 2000. p. 817-8.
- Wong T, Stang AS, Ganshorn H, Hartling L, Maconochie IK, Thomsen AM, Johnson DW. 2014. Combined and alternating paracetamol and ibuprofen therapy for febrile children. *Evidence-Based Child Health* 9(3)730-732.



Propuesta para la estandarización de endotoxinas bacterianas y pirógenos en dos productos farmacéuticos parenterales por los métodos del lisado de amebocitos de *Limulus* y la prueba de activación de monocitos

Proposal for the standardization of bacterial endotoxins and pyrogens in two parenteral pharmaceutical products by the *Limulus* amoebocyte lysate and the monocyte activation test methods

ANDREA V. REQUENA^{a,1}, MARLY SUÁREZ^{a,2}, MARIED ROJAS^{a,3}, ANA CARVAJAL^{*a,4}, ANA AGATÓN^{b,d,5}, GENNY URQUÍA^{a,b,6}, HEISEL UROSA^{a,b,7}, IDAMELIS RODRÍGUEZ^{a,b,8}, MARÍA ISABEL CALDERÓN^{a,b,9}, CRICELIS MARTÍNEZ^{a,10}, MICHAEL R. MUJARES^{a,b,c,11}

Resumen

La detección de pirógenos en productos parenterales es de suma importancia en la industria biotecnológica, la industria farmacéutica, los laboratorios de control de la calidad y agencias regulatorias. Los pirógenos son sustancias que provocan fiebre y no se eliminan mediante los procesos de esterilización estándar, siendo biológicamente activos una vez que se encuentran en el torrente sanguíneo, lo que provoca riesgos para la salud humana, que van desde reacciones leves (por ejemplo, fiebre) hasta shock séptico y muerte. Por lo tanto, la prueba de pirógenos es obligatoria para las formulaciones de fármacos y biotecnológicos inyectables, terapias celulares y diversos dispositivos médicos. Las pruebas de pirógenos son ensayos de seguridad realizados durante el control de calidad de rutina de los productos inyectables exigidos por las agencias reguladoras. Entre dichas pruebas de pirógenos se encuentran: 1) la Prueba de Endotoxinas Bacterianas (BET, LAL) y 2) Los sistemas de prueba que utilizan sangre total humana o monocitos humanos, denominada Prueba de Activación de Monocitos (MAT). En el presente trabajo se comparan las metodologías a seguir de los ensayos LAL gel clot, LAL cromogénica y MAT para la estandarización de pirógenos incluyendo las EB en dos productos farmacéuticos parenterales: penicilina G sódica y ranitidina inyectable.

Palabras clave: Endotoxinas bacterianas, pirógenos, penicilina G, ranitidina inyectable, Lisado de Amebocitos del *Limulus* (LAL), prueba de activación de monocitos (MAT)

Abstract

The detection of pyrogens in parenteral products is of great importance in the biotechnology industry, the pharmaceutical industry, quality control laboratories, and regulatory agencies. Pyrogens are substances that cause fever and are not removed by standard sterilization processes, being biologically active once in the bloodstream, causing risks to human health, ranging from mild reactions (for example, fever) to septic shock and death. Therefore, pyrogen testing is mandatory for injectable drugs and biotech formulations, cell therapies, and various medical devices. Pyrogen tests are safety tests performed during routine quality control of injectable products required by regulatory agencies. Such tests for pyrogens include: 1) Bacterial Endotoxin Test (BET, LAL) and 2) Test systems using human whole blood or human monocytes, called the Monocyte Activation Test (MAT). This work compares the methodologies to be followed by LAL gel clot, chromogenic LAL, and MAT assays for the standardization of pyrogens, including BET in two parenteral pharmaceuticals: sodium penicillin G and injectable ranitidine.

Keywords: Bacterial endotoxins, pyrogens, sodic penicillin G, ranitidine, *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL), Monocyte Activation Test (MAT)

^aCátedra de Microbiología Aplicada, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. ^bUnidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. ^cInstituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, 50109, Los Chaguaramos 1050-A, Caracas, Venezuela. ^dInstituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela. *Correspondencia: anestella.carvajal@gmail.com.

Orcid: ¹[0000-0001-9762-1767](https://orcid.org/0000-0001-9762-1767)

⁶[0009-0002-3200-0112](https://orcid.org/0009-0002-3200-0112)

¹¹[0000-0002-0055-2804](https://orcid.org/0000-0002-0055-2804)

²[0000-0001-8106-2905](https://orcid.org/0000-0001-8106-2905)

⁷[0009-0002-3173-2135](https://orcid.org/0009-0002-3173-2135)

³[0000-0001-8117-6961](https://orcid.org/0000-0001-8117-6961)

⁸[0000-0002-7467-0926](https://orcid.org/0000-0002-7467-0926)

⁴[0000-0002-1546-3337](https://orcid.org/0000-0002-1546-3337)

⁹[0000-0002-2094-8638](https://orcid.org/0000-0002-2094-8638)

⁵[0009-0008-4228-1409](https://orcid.org/0009-0008-4228-1409)

¹⁰[0000-0002-8204-0174](https://orcid.org/0000-0002-8204-0174)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.6](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.6)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 00/00/2023

Aprobación: 00/00/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 44-55. 2023

Introducción

Los pirógenos son compuestos inductores de fiebre tras su administración intravenosa o inhalación. Se originan a partir de las bacterias Gram negativas y positivas, los virus, hongos o del propio hospedador (Dullah y Ongkudon, 2017, Prajitha et al., 2018). Los pirógenos externos se clasifican en dos grandes grupos: pirógenos endotóxicos o endotoxinas bacterianas (EB), los cuales provienen de bacterias Gram negativas, y pirógenos no endotóxicos (NEP), derivados principalmente de bacterias Gram positivas y hongos. La presencia de cualquiera de ellos en productos farmacéuticos parenterales o dispositivos médicos puede causar daños graves a los pacientes y, cuando las EB y los NEP se encuentran simultáneamente pueden producir efectos sinérgicos (Solati y col., 2022).

PRUEBA DEL LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS (LAL)

La Prueba del Lisado de Amebocito de Limulus (LAL) es un método para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas ampliamente utilizado por la industria farmacéutica y biotecnológica, para la determinación de la seguridad de los medicamentos parenterales y de los dispositivos médicos (Ding y Ho, 2010). Su principio bioquímico se basa en la reacción de coagulación entre el factor C procedente de los extractos de amebocitos de la sangre de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* o cangrejo herradura del Atlántico, en presencia de antígenos de superficie microbiana como los lipopolisacáridos del orden de los picogramos o endotoxinas bacterianas (Akbar y col., 2012). En presencia de endotoxinas, el LAL se vuelve turbio y, bajo las condiciones adecuadas,

forma un coágulo de gel sólido (Ding y Ho, 2010). Este ensayo fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1983 como un método confiable para la determinación de las EB (Munson, 1985). Las pruebas o los ensayos LAL o BET se basan en una reacción de coagulación entre el factor C procedente de los extractos de amebocitos de la sangre del *Limulus polyphemus* o del cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus* (ambas especies están en peligro de extinción) en presencia de cantidades de LPS del orden de los picogramos (Akbar y col., 2012).

El ensayo de LAL se puede dividir en tres técnicas básicas: las técnicas de gel-clot, turbidimétricas y cromogénicas (WHO, 2020).

La técnica gel-clot, se basa en una solución de lisado que forma un gel en presencia de EB, siendo el método de referencia. Un resultado positivo o negativo de este método se obtiene mezclando la muestra con un lisado en un tubo de ensayo. Si la concentración de EB de la muestra es superior al límite de detección, se formará un coágulo de gel en el fondo del tubo (WHO, 2020).

Las otras dos técnicas para la prueba de LAL, a saber, las técnicas turbidimétrica y cromogénica, son métodos fotométricos para determinar cuantitativamente la concentración de EB. En el método cromogénico se mide la liberación de cromóforos de un péptido cromogénico adecuado debido a la reacción de las EB con el lisado o se determina la intensidad de fluorescencia después de la reacción. Las pruebas LAL turbidimétricas y cromogénicas son más precisas y sensibles que el método del coágulo de gel, aunque este último es

el más simple de llevar a cabo y es el más utilizado a nivel mundial (Yamamoto y col., 2020).

Entre las limitaciones del ensayo de LAL se encuentra, que es una prueba específica para el componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Por lo tanto, el ensayo LAL no es aplicable para muestras que contengan pirógenos provenientes de bacterias Gram positivas (Peterbauer y col., 2000). Adicionalmente, diversos componentes plasmáticos, entre ellos proteínas, pueden afectar la sensibilidad y especificidad del ensayo de LAL al neutralizar las EB (Harm y col., 2021).

Otra limitación importante en el ensayo de LAL se refiere a la presencia de las nanopartículas que a menudo interfieren con este ensayo creando una importante limitación para el desarrollo preclínico y el control de la calidad de los medicamentos formulados con nanotecnología y dispositivos médicos que contienen nanomateriales de ingeniería (Dobrovolskaia y col., 2010).

PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS (MAT)

La MAT fue concebida por primera vez como una alternativa a las pruebas RPT (Rabbit Pyrogen Test) y LAL por Poole y col. en la década de 1980 y se basa en el aislamiento de monocitos de sangre humana periférica y su incubación con una muestra analizada para determinar el contenido de pirógenos, para imitar la respuesta de la fiebre a los pirógenos *in vivo* (Poole y col., 1988). Los monocitos participan en la respuesta inmunitaria innata y expresan receptores tipo Toll que se unen a los pirógenos, lo cual estimula la liberación de citocinas proinflamatorias (p. ej., IL-6, IL-1 β o TNF α) que pueden

ser cuantificadas (Daniels y col., 2022). En consecuencia, la cantidad de citocinas proinflamatorias, IL-6 o IL-1 β liberadas es una medida de la pirogenicidad de una sustancia (Duff y Atkins, 1982; EP: 2010). Este método puede detectar hasta 10 pg/mL de EB, e incluso menos usando sangre crioconservada. Dado que el MAT utiliza sangre humana, es posiblemente el método de detección de EB *in vitro* más ventajoso, ya que no involucra ningún producto animal (Daniels y col., 2022).

Aunque hay varias fuentes de células que puedan ser utilizadas en el ensayo de MAT, los monocitos comúnmente utilizados generalmente se derivan de la sangre entera humana, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y líneas celulares monocíticas (Daniels y col., 2022). Este método es muy sensible, rentable, no utiliza animales vivos o sus productos, y cada día está recibiendo una mayor aprobación de diversas agencias regulatorias a nivel internacional.

El MAT se convirtió en un método de la Farmacopea Europea en 2010 (EP 2.6.30) (EP: 2010). La monografía de la Farmacopea Europea describe tres métodos para el MAT y se puede usar sangre total PBMC, o líneas celulares monocíticas para cualquiera de estos métodos (Eperon y col., 1997).

El ensayo de MAT ha sido validado con éxito para la determinación de los pirógenos provenientes de EB y NEP de bacterias Gram positivas, virus y hongos, en diversos productos biológicos.

En línea con los esfuerzos globales para reducir el uso de animales en los ensayos de investigación y en las pruebas de control de la calidad, el MAT tiene el potencial de reemplazar la RPT. Finalmente,

es importante recordar que a pesar de las ventajas del MAT respecto al RBT y el LAL, la implementación exitosa de este ensayo de monocitos requiere de la optimización y validación del ensayo para cada producto de prueba de forma particular.

La penicilina G sódica (también llamada bencilpenicilina sódica) es un antibiótico betalactámico con actividad bactericida. Esta actúa inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicano de la pared celular bacteriana al unirse e inactivar a las enzimas involucradas en el proceso. Dicha interferencia genera una estructura osmóticamente inestable que provoca la muerte del patógeno mediada por autolisinas endógenas. (INHRR, 2022).

Por otra parte, la ranitidina es un antagonista competitivo del receptor H₂ de histamina. Inhibe la acción de la histamina sobre los receptores H₂ de las células parietales en el estómago, reduciendo con ello la secreción (tanto basal como estimulada) de ácido gástrico (INHRR, 2018).

El presente trabajo tiene como objetivo la revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre la determinación de endotoxinas por los métodos Lisado de Amebocitos del Limulus LAL en su variante de gel-clot y cromogénica, y la prueba de activación de monocitos (MAT) para la determinación de endotoxinas bacterianas y pirógenos en dos productos farmacéuticos parenterales: penicilina G sódica y ranitidina inyectable. MAT en penicilina G sódica y ranitidina.

Para ello se procedió a 1. Confirmar la sensibilidad declarada para el reactivo de LAL y su Media Geométrica para el método de gel-clot. 2. Determinar la Máxima

Dilución Válida en los métodos de gel-clot y cromogénico. 3. Estandarizar la prueba de factores de interferencia en los métodos de gel-clot y cromogénico, y 4. Estandarizar la técnica y metodología para la prueba de activación de monocitos.

Metodología

1. PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

La Farmacopea de los Estados Unidos (United States of Pharmacopeia, USP) establece para formulaciones con penicilina G sódica un contenido de endotoxinas de no más de 0,01 Unidades de Endotoxina USP por 100 Unidades de penicilina G; y para formulaciones con ranitidina inyectable, no más de 7,00 Unidades de Endotoxina USP por mg de ranitidina, respectivamente.

1.1 Técnica de coagulación gel-clot

- Reactivos y soluciones: (Associates of Cape Cod Inc).
- Pyrotell® de sensibilidad 0,25 UE/mL
- Agua para Prueba de Endotoxinas Bacterianas
- Estándar de Referencia de Endotoxina USP (CSE) de *Escherichia coli* O113:H10: CSE de 0,5 µg/vial o 125 µg/vial

Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL

Se verifica la sensibilidad declarada en la etiqueta del lisado que se va a utilizar preparando una curva estándar de EB con al menos 4 concentraciones equivalentes a 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$ (cada una por cuatriplicado).

Se preparan las soluciones de CSE, asumiendo que la sensibilidad del LAL es de $\lambda=0,25\text{UE/mL}$ y la potencia del CSE sea igual a 10UE/ng .

A cada concentración de EB se le agrega la misma cantidad de reactivo LAL (relación 1:1 o $0,1\text{mL}:0,1\text{mL}$) y se deja incubar durante 1 hora a 37°C . Posteriormente se observa si hubo formación de un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos (resultado positivo) o si se observa un gel no firme o líquido transparente (resultado negativo).

La prueba se considera válida cuando la concentración más baja de las CSE presenta un resultado negativo en todas las pruebas repetidas.

Para proceder al cálculo de la media geométrica (MG), se debe verificar que todos los tubos de control negativo hayan dado resultados negativos para considerar la prueba como válida. De ser válida la prueba, se debe determinar el punto final, considerando como punto final a la última dilución en la cual se obtuvo resultado positivo.

La MG de la concentración en el punto final es la sensibilidad medida del Lisado (en UE/mL), por lo que:

$$2\lambda \geq \text{MG} \geq 0,5 \lambda$$

Si la MG no difiere en más de un factor de 2 de la sensibilidad teórica, se puede decir que la sensibilidad del LAL cumple y se puede aprobar para la prueba de EB.

Cálculo de la Máxima Dilución Válida (MDV)

La sensibilidad del reactivo LAL (λ) para la técnica gel-clot declarada es $0,25 \text{ UE/}$

mL , el límite de endotoxina de la penicilina G sódica y la ranitidina es de $0.01 \text{ UE}/100 \text{ UI}$ y $7,00 \text{ UE/mg}$, respectivamente. La concentración de la penicilina G sódica es de $1.000.000\text{UI/mL}$ y de la ranitidina 25mg/mL , por lo que se obtiene una máxima dilución válida (MDV) de 1:400 para la penicilina G sódica y 1:700 para la ranitidina.

Prueba de factores de interferencia

Se debe efectuar la prueba de inhibición o potenciación en las soluciones de la muestra con una dilución menor que la MDV:

MDV penicilina G sódica: 1:400 \rightarrow 1:200

MDV ranitidina: 1:700 \rightarrow 1:350

La preparación de soluciones de la muestra para la prueba de Inhibición/potenciación para las técnicas de coagulación se realiza de acuerdo a la Tabla I.

Luego de preparada las soluciones, se debe mezclar un volumen del LAL reconstituido igual al volumen final de cada uno de los tubos de ensayo (relación 1:1 o $0,1\text{mL}:0,1\text{mL}$) y se deja incubar durante 1 hora a 37°C .

Esta prueba se considera válida cuando:

Solución A: No muestra ningún coágulo. Si la muestra sin endotoxina coagula, hay endotoxinas en el producto y la muestra está claramente no inhibida.

Solución B: La muestra con endotoxina debe coagular. Observar en qué dilución se comienza a coagular la muestra (esta dilución debe ser menor a la MDV).

Tabla I.

Preparación de Soluciones de Muestra para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnica gel-clot

Solución	Solución a analizar	Factor de dilución	Concentración de endotoxina UE/ML	Número de réplicas
A	Diluciones de la muestra con LRW	1:1	N/A	4 c/u
		1:2		
		1:4		
		1:8		
		1:16		
		1:32		
		1:64		
		1:128		
		1:256		
B	Diluciones de la muestra con solución de endotoxina	1:2	2	4 c/u
		1:4		
		1:8		
		1:16		
		1:32		
		1:64		
		1:128		
		1:256		
C	2 / LRW	1	2	2 c/u
		1:2	1	
		1:4	0,5	
		1:8	0,25	
D	Control Negativo (LRW)	N/A	N/A	2 c/u

Solución C: Debe confirmar la sensibilidad declarada del reactivo LAL.

Solución D: No muestra ninguna reacción.

- Agua para prueba de EB: Agua Reactiva LAL (LRW).

- Ácido acético al 50%: prepararlo con LRW.

2. Técnica cromogénica

Reactivos y soluciones

- Pyrochrome® de sensibilidad 0,005 UE/mL; Pyrochrome® Reconstitution Buffer; CSE USP de *Escherichia coli* O113:H10 de 0,5 µg/vial o 125 µg/vial (Associates of Cape Cod Inc).

Determinación de la Curva Estándar

Se construye una curva estándar que represente la densidad óptica (DO) vs las concentraciones de CSE. La Sensibilidad declarada del PyroChrome® es =0,005 UE/mL y la potencia CSE es igual a 10UE/ng (1000UE/mL). Por recomendación del

fabricante, se preparan 5 concentraciones de CSE (R1 –R5): 0,005; 0,05; 0,5; 5 y 50 UE/mL.

Cálculo de la MDV: la sensibilidad declarada del reactivo LAL (λ) para la técnica cromogénica es 0,005 UE/mL, el límite de endotoxina de la penicilina G sódica y la ranitidina es de 0,01 UE/100 UI y 7,00 UE/mg, respectivamente. La concentración de la penicilina G sódica es de 1.000.000UI/mL y de la ranitidina 25mg/mL, por lo que se obtiene una MDV de 1:20000 para la penicilina G sódica y 1:35000 para la ranitidina.

Cálculo de la Concentración Mínima Válida (CMV):

La dosis de muestra de la ranitidina es de 1mg/kg, por lo cual:

$$CMV=(0,005UE/mL) \times (1mg/kg) (5 UE/kg)=0,001mg/mL$$

La dosis de muestra de la penicilina G sódica es de 200.000 UI/kg, por lo cual:

$$CMV=(0,005UE/mL) \times (200.000UI/kg) (5 UE/kg)=200UI/mL$$

Prueba para factores de interferencia

Se debe efectuar la prueba de inhibición o potenciación en las soluciones muestra con una dilución menor que la MDV:

$$MDV \text{ penicilina G sódica: } 1:20000 \rightarrow 1:10000$$

$$MDV \text{ ranitidina: } 1:35000 \rightarrow 1:17500$$

La preparación de soluciones de la muestra para la prueba de inhibición/potenciación para técnicas fotométricas se realiza de acuerdo con la Tabla II.

La prueba se considera válida cuando el valor absoluto del coeficiente de correlación

de la curva estándar generada usando la solución C es mayor o igual a 0,980 y el resultado de la solución D no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción del lisado empleado como reactivo o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo.

Procedimiento de la prueba

Colocar por duplicado 0,05mL de las soluciones A, B, C y D en cada pocillo de una microplaca y transferir 0,05mL del reactivo LAL a todos los pocillos. Agitar durante 5 a 30 segundos todos los tubos e incubar la mezcla en baño de agua a $37 \pm 1^\circ$ durante 60 minutos. Detener la reacción añadiendo 0,025mL de ácido acético al 50% a cada pocillo y medir la DO a 405nm en un lector de microplacas.

Calcular la concentración de EB de cada una de las determinaciones empleando la ecuación de la recta:

$$Y=aX + b \text{ reordenada como } X = (Y-b)/a$$

La prueba se considera válida cuando se cumplen las tres condiciones siguientes:

1. Los resultados de la solución C de control cumplen con los requisitos de validación definidos en Garantía de Criterios para la Curva Estándar.
2. La recuperación de EB, calculada a partir de la concentración encontrada en la solución B después de restar la concentración de EB encontrada en la Solución A está dentro del intervalo de 50%-200%.
3. El resultado de la solución D de control negativo no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción

Tabla II.

Preparación de Soluciones de Muestra para la Prueba de Inhibición/
Potenciación para Técnicas fotométricas

Solución	Concentración de endotoxinas	Solución a la cual se le agrega endotoxina	Número de repeticiones
A	Ninguna	de penicilina G sódica	2
		de ranitidina	2
B	R3 = 0,5 UE/mL	de penicilina G sódica	2
		de ranitidina	2
C	R1 = 0,005 UE/mL	LRW	2
	R2 = 0,05 UE/mL	LRW	2
	R3 = 0,5 UE/mL	LRW	2
	R4 = 5 UE/mL	LRW	2
	R5 = 50 UE/mL	LRW	2
D	Ninguna	LRW	2

del lisado empleado o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo.

2. PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS

En la presente publicación se discute la metodología a seguir del método A para la estandarización de pirógenos en penicilina G sódica y ranitidina inyectable utilizando el sistema PyroMAT® que se basa en la línea celular Mono-Mac-6 y en la lectura de IL-6.

Reactivos y soluciones

- Células PyroMAT® Mono-Mac-6 criopreservadas (MERCK).
- CSE con 10,000 UE liofilizada (MERCK).
- Kit PyroMAT™ (MERCK).
- Control de pirógenos no endotóxicos (NEP) HKSA (MERCK).

- IL-6 control (MERCK).
- Agua destilada.

Se prepara la solución estándar EB para obtener una concentración de 2000 UE/mL se utiliza como solución madre para preparar diluciones en serie.

A su vez, se prepara el control de NEP con una concentración resultante de 1000X, la cual se utiliza como solución madre para preparar diluciones en serie de 100X (spike), 10X y 1X (control positivo) que servirán para el análisis.

Prueba de factores de interferencia

- Cálculo de la MDV: el límite de detección del sistema utilizado es 0,05 UE/mL, la Concentración Límite de Contaminantes, a (CLC) de la penicilina G sódica y ranitidina es 0,01 UE/100 UI y 7,00 UE/mg, respectivamente. En el mercado venezolano se encuentra la penicilina como polvo estéril para reconstituir la solución inyectable de 1.000.000 UI y la ranitidina como solución inyectable de 50 mg² mL. Se obtuvo para la penicilina un MDV de 1:2000 y para la ranitidina 1:3500.

Diluir la muestra de acuerdo con lo indicado en la sección de preparación de la muestra descrito. usar la curva de CSE para calcular la concentración de equivalentes de EB en cada solución. Calcular la recuperación media de la EB añadida restando la concentración media de equivalentes de la EB en la solución de la solución que contiene la EB añadida.

Metodología para el método A: Prueba cuantitativa:

Se comparan las muestras de penicilina G sódica y ranitidina con una curva de dosis-respuesta de CSE que se medirá mediante un kit PyroMAT™ cuya sensibilidad es de 0,05UE/mL. Para hacer la curva se prepara una dilución de concentración 20UE/mL para utilizar como spike y como solución de partida para preparar las soluciones de EB a 7 concentraciones (R1-R7): 0,0125UE/mL, 0,025UE/mL, 0,05UE/mL, 0,1UE/mL, 0,2UE/mL, 0,4UE/mL y 0,8UE/mL. Los resultados de la curva serán aceptados si hay una regresión estadísticamente significativa de la respuesta medida en la concentración de CSE y la regresión de las respuestas sobre la dosis logarítmica no se desvía significativamente de la linealidad.

Preparación de la muestra

- **Muestra no contaminada:** La muestra se analiza a 3 niveles de dilución que no superen la MDV. Las pruebas de factores de interferencia experimentales para la PEB plantearon que posibles diluciones de trabajo para la penicilina G sódica es 1:100, y para la ranitidina podría ser 1:200 (Carrillo y col., 2006). Resultando para la penicilina G sódica diluciones de 1:40 (f), 1:80 y 1:160; y para la ranitidina diluciones de 1:50 (f), 1:100 y 1:200.
- **Muestra con la CSE como spike:** Cada dilución de muestra se contamina con 0,2 UE/mL (Utilizando la solución de endotoxina a 20 EU/mL como spike).
- **Muestra con NEP como spike:** Solo la dilución 1 de la muestra se contamina con 1X de NEP (Utilizando la Solución 100X como spike).

El llenado de la placa se realiza agregando 50 μ L a cada pocillo con la curva estándar, las muestras y los controles. Una placa permite analizar 2 muestras, por lo que se dispondrá de la forma que se indica en la Tabla III.

Preparación de las células PyroMAT®

Un vial de células es suficiente para la mitad de una placa de 96 pocillos, por lo cual se necesitarán 2 viales suspendidos en 20mL de medio de cultivo para realizar el análisis de las 2 muestras.

Llenado de la placa con cultivo celular de células PyroMAT®

Dispensar 200 μ L de medio de cultivo con células por pocillo con una pipeta P1000 para evitar daños en las células.

Incubación de la placa

Incubar la placa con cultivo celular durante 22 ± 2 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda sin CO₂.

Detección de IL-6 por ELISA mediante el protocolo estándar

Transferir 100 μ L/pocillo del sobrenadante celular a la microplaca ELISA. Añadir 200 μ L/pocillo del control de IL-6 e Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, vaciar la microplaca ELISA y añadir 400 μ L/pocillo de buffer de lavado, vaciar la microplaca ELISA, invertir y secar contra toallas de papel limpias (repetir este paso 3 veces más, para un total de 4 lavados).

Dejar el buffer de lavado en la placa mientras se prepara la solución de sustrato y se deja reposar por 15 minutos. Añadir 200 μ L/pocillo de solución de sustrato e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente,

Tabla III.

Preparación de las muestras, estándares y controles en Prueba de Activación de Monocitos (MAT)

	CURVA ESTÁNDAR				ANÁLISIS PENICILINA G SÓDICA				ANÁLISIS RANITIDINA			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco = 0 UE/mL (Agua LRW)				Dilución 1:40				Dilución 1:50			
B	R1 = 0,0125 UE/mL				Dilución 1:40 + spike RSE				Dilución 1:50 + spike RSE			
C	R2 = 0,025 UE/mL				Dilución 1:80				Dilución 1:100			
D	R3 = 0,05 UE/mL				Dilución 1:80 + spike RSE				Dilución 1:100 + spike RSE			
E	R4 = 0,1 UE/mL				Dilución 1:160				Dilución 1:200			
F	R5 = 0,2 UE/mL				Dilución 1:160 + spike RSE				Dilución 1:200 + spike RSE			
G	R5 = 0,4 UE/mL				Dilución 1:40 + spike NEP				Dilución 1:50 + spike NEP			
H	R7 = 0,8 UE/mL				Solución 1X de NEP							

protegido de la luz. Por último, agregar 50 μ L/pozo de solución de parada y mezclar completamente.

Lectura de la microplaca

Medir la DO a 450 nm y 630 nm. La placa se puede leer dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Interpretación de los resultados

La muestra contiene NEP si la diferencia de señal entre la muestra con spike y la muestra sin spike, expresado en EEU/mL, está por encima del LOD = 0,05 EEU/mL.

Para cada dilución de muestra válida, la señal de OD se convierte en EEU/mL, se corrige con el factor de dilución y se compara con la Concentración Límite de Contaminantes (CLC) para concluir que la muestra analizada:

Cumple: Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de penicilina G sódica es < 0,01 UE/100UI, o Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de ranitidina es < 7 UE/mL

No cumple: Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de penicilina G sódica es < 0,01 UE/100UI, o Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de ranitidina es < 7 UE/mL.

Conclusiones

Se realizaron los cálculos y revisión teórica para la estandarización de las pruebas de EB en dos soluciones estériles, penicilina G sódica y ranitidina inyectable por la prueba de LAL mediante el método de gelificación y el método cromogénico, además de la MAT.

Se discutieron los sistemas que existen en el mercado, como el Pyrotell[®], Pyrochrome[®] y PyroMAT[®].

Los métodos cuantitativos se emplean si satisfacen los requisitos para métodos alternativos, pero, en caso de discrepancias, el resultado obtenido con el método de gel clot en tubo es el definitorio.

El método de MAT es la única prueba de pirógenos realizada en una línea celular e imita la reacción inmunitaria humana, permite la determinación de endotoxinas provenientes de bacterias gram negativas, y además de NEP de bacterias gram positivas, levaduras, hongos, virus. El MAT permite la eliminación del uso de experimentación con animales.

Recomendaciones

La realización de este proyecto pretendió ser una revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre la determinación de endotoxinas por los métodos LAL y MAT en penicilina G sódica y ranitidina, por lo que se recomienda llevar a cabo los ensayos pertinentes para comprobar los análisis propuestos en el mismo.

Agradecimientos

Agradecemos a los profesores de la Cátedra de Microbiología Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por colaborar en la realización de nuestro proyecto.

Referencias

Akbar JB, Kamaruzzaman BY, Jalal KCA, Kasimm Z. 2012. TAL – a source of bacterial endotoxin detector in liquid biological samples. *Int Food Res J* 19:423-5.

Associates of CAPE COD Incorporated Specialists in Endotoxin and Glucan Detection. Pyrochrome® Chromogenic Endotoxin Testing Reagents. Available online: <https://www.acciusa.com/products-and-services/bet-products/lal-reagents/pyrochrome>.

Associates of CAPE COD Incorporated Specialists

in Endotoxin and Glucan Detection. Pyrotell® Gel-clot Formulation. Available online: <https://www.acciusa.com/products-and-services/bet-products/lal-reagents/pyrotell>.

Carrillo C, Ospina J, Aldana D, Arias J, Echeverri C. 2006. Valoración de endotoxinas bacterianas en Ranitidina y Penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de Lisado del Amebocito de Limulus. *Universitas Scientiarum. Rev Facultad de Ciencias* 11(1):15-28.

Daniels R, Van der Elst W, Dieltjens N, Appels T, So CK, Nys T, Liesbeth Voeten L, Breugelmans P, Molenaar-de Backer MWA, Gitz E, Poole S, Patel M. 2022. Validation of the monocyte activation test with three therapeutic monoclonal antibodies. *ALTEX* 39(4):621-635.

Ding JL, Ho B. 2010. Endotoxin detection--from Limulus amebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem* 53:187-208.

Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Ding H, Ljubimova J, McNeil SE. 2010. Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. *Nanomedicine (Lond)* 5(4):555-62.

Duff GW, Atkins E. 1982. The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen: comparison with limulus amebocyte lysate gelation. *J Immunol Methods* 52(3):323-31.

Dullah EC, Ongkudon CM. 2017. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions. *Crit Rev Biotechnol* 37(2):251-261.

EP: 2010. 9.2, E.P. Chapter 2.6.30. Monocyte-activation test. Available online: <http://www.bravvam.fiocruz.br/wp-content/uploads/2022/05/MAT20630E-2017.pdf>

Harm S, Schildböck C, Strobl K, Hartmann J. 2021. An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the Limulus amebocyte lysate test. *Sci Rep* 11(1):4192.

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Sistema de Información de Medicamentos. Fichas farmacológicas: bencilpenicilina sódica, 2022. http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20170104113147_4836.pdf

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Sistema de Información de Medicamentos. Fichas farmacológicas: ranitidina 150mg y 300mg, 2018. http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20180517093422_1974.pdf

Merck: 2019; PyroMAT™ System, Monocyte Activation Test (MAT). Available online: <https://www>.

- merckmillipore.com/VE/es/products/industrial-microbiology/pyrogen-testing/monocyte-activation-test/2cKb.qB.zawAAAE_vQR3.Lxj,nav
- Munson TE. 1985. Guideline for validation of the LAL test as an end-product endotoxin test for human and biological drug products. *Prog Clin Biol Res* 189:211-20.
- Peterbauer A, Eperon S, Jungi TW, Werner ER, Werner-Felmayer G. 2000. Interferon-gamma-primed monocytoïd cell lines: optimizing their use for in vitro detection of bacterial pyrogens. *J Immunol Methods* 233(1-2):67-76.
- Poole S, Thorpe R, Meager A, Hubbard AR, Gearing AJ. 1988. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet* 1(8577):130.
- Prajitha N, Athira SS, Mohanan PV. 2018. Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections. *Immunol Lett* 204:38-46.
- Solati S, Zhang T, Timman S. 2022. The monocyte activation test detects potentiated cytokine release resulting from the synergistic effect of endotoxin and non-endotoxin pyrogens. *Innate Immun* 28(3-4):130-7.
- USP: 2021; United States Pharmacopeia (USP). (151) Pyrogen test. In: USP 44/NF 39, U. S. Pharmacopeial Convention, Rockville, pp. 166e168.
- WHO 2020. World Health Organization. (3.5 Test for pyrogens) in: *The International Pharmacopoeia - Tenth Edition*, Geneva World Health Organization, Dept. of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies, 2020a. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#p/home.3>
- Yamamoto A, Ochiai M, Fujiwara H, Asakawa S, Ichinohe K, Kataoka M, Toyozumi H, Horiuchi Y. 2000. Evaluation of the applicability of the bacterial endotoxin test to antibiotic products. *Biologicals* 28(3):155-67.



Análisis comparativo de diferentes formulaciones de Anfotericina B y su incidencia sobre la seguridad del paciente

Comparative analysis of different formulations of Amphotericin B and their impact on patient safety

GABRIEL E. HERNÁNDEZ ZAMBRANO¹, ANA P. PEREIRA CORREIA², DANIEL A. PIRE ÁLVAREZ³, ESTHEFANY R. REQUEZ CABRERA⁴, GABRIELA A. SIMOZA LÓPEZ^{5,*}

Resumen

La Anfotericina B desoxicolato es un agente antifúngico de amplio espectro, activo contra la mayoría de las especies de hongos clínicamente relevantes. Su mecanismo principal consiste en formar complejos con el ergosterol en las membranas celulares de los hongos. Este fármaco está vinculado con fuertes efectos adversos relacionados a la infusión e importante nefrotoxicidad, por lo que se desarrollaron diferentes formulaciones solubles en lípidos que han mejorado su perfil de seguridad, generando mayor confianza y adherencia a esta terapia; sin embargo, existen diferencias significativas dentro de las diferentes formulaciones solubles en lípidos. Tras varios estudios comparativos realizados entre las diferentes formas de Anfotericina B, se ha determinado que las nuevas tecnologías que permiten encapsulación del principio activo a través de liposomas benefician al paciente en la seguridad y efectividad; mejora su absorción, penetración y difusión, al mismo tiempo que estabiliza el principio activo y ofrece una mayor protección contra la oxidación. Además, la presencia de lípidos le confieren mayor afinidad y especificidad en el organismo. Sin embargo, el simple hecho de desarrollar un liposoma no asegura que el mismo posea características ideales, por lo que es de gran importancia identificar y controlar los parámetros críticos del proceso de manufactura que permitan asegurar la reproducibilidad lote a lote y la obtención de un producto de calidad que brinde seguridad y eficacia desde el momento de su desarrollo hasta el instante de la administración directa al paciente.

Palabras clave: Anfotericina B, antifúngico, efectos adversos, nefrotoxicidad, lípidos, liposomas, perfil de seguridad, especificidad, parámetros críticos

Abstract

Amphotericin B deoxycholate is a broad-spectrum antifungal agent, active against most clinically relevant fungal species. Its main mechanism consists of forming complexes with ergosterol in the cell membranes of fungi. This drug is associated with strong side effects related to the infusion and significant nephrotoxicity, which is why different lipid-soluble formulations have been developed to improve its safety profile, increasing confidence and adherence to this therapy; however, there are significant differences within the different lipid soluble formulations. After several comparative studies carried out between the different forms of Amphotericin B, it has been determined that new technologies allowing the encapsulation of the active drug through liposomes bring great benefits to the patient regarding safety and efficacy; improve its absorption, penetration, and diffusion, while stabilizing the active principle and offering greater protection against oxidation. In addition, presenting lipids increases affinity and specificity within the body. However, simply creating a liposome does not ensure that it has ideal characteristics, so it is of great importance to be able to identify and control the critical parameters of the manufacturing process that ensure batch-to-batch reproducibility and obtaining a quality product that provides safety and efficacy from the moment of its development until direct administration to the patient.

Keywords: Amphotericin B, antifungal, adverse effects, nephrotoxicity, lipids, liposomes, safety profile, specificity, critical parameters

Facultad de Farmacia, UCV, *Correspondencia: gabi.simoza@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0002-6625-6848](https://orcid.org/0000-0002-6625-6848)

² [0000-0003-1183-3297](https://orcid.org/0000-0003-1183-3297)

³ [0000-0003-3865-4360](https://orcid.org/0000-0003-3865-4360)

⁴ [0000-0001-8234-8032](https://orcid.org/0000-0001-8234-8032)

⁵ [0000-0003-0819-2863](https://orcid.org/0000-0003-0819-2863)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.7)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 02/05/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 56-69. 2023

Introducción

Actualmente, se reconoce que los hongos tienen un papel importante en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas y su desaparición podría afectar directamente la subsistencia de otras especies. Sin embargo, Alcántara (2010) establece que, aún existe resistencia para reconocer su impacto global en la salud humana, posiblemente porque muchas de las infecciones fúngicas cursan de manera asintomática o con manifestaciones intermedias. De esta manera, la vigilancia epidemiológica se enfoca principalmente en los casos severos.

La Fundación de Acción Global para las Infecciones Fúngicas (*GAFFI*) ha estimado de manera reciente que más de 300 millones de personas en el mundo padecen enfermedades severas de etiología fúngica, y se calcula que cada año ocurren 1.6 millones de muertes, lo que es superior al número de defunciones por malaria y tuberculosis (Rivera, 2020).

Durante las últimas décadas, la incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado, principalmente en pacientes con algún grado de inmunosupresión, receptores de trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes y usuarios de la unidad de cuidado intensivo; esto a causa del progreso de la medicina con quimioterapias más agresivas, el uso de corticosteroides y uso de forma indiscriminada de antimicrobianos de amplio espectro, generando variantes más virulentas resistentes a antimicóticos (Pemán y Salavert, 2012).

Rivera (2020) establece que las 300 especies de hongos reconocidas como patógenas para los humanos, incluidas en los géneros *Candida*, *Aspergillus*,

Histoplasma, *Pneumocystis* y *Cryptococcus* son las principales causales de enfermedad severa.

Actualmente, existen cinco grupos de fármacos antifúngicos que se utilizan en la clínica, clasificados con base en su estructura química: Azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas y polienos, dentro de los cuales se encuentra la Anfotericina B (Gregorí, 2005).

En 1959 fue aprobada por la *Food and Drugs Administration* (FDA), por primera vez, la Anfotericina B bajo la forma soluble de desoxicolato de sodio, sin embargo, al evaluar las reacciones que presentaban los pacientes bajo dicho tratamiento, se observó un elevado porcentaje de efectos adversos que supera sus beneficios (Suberviola, 2022).

La formulación de anfotericina B desoxicolato ha sido ampliamente estudiada con el fin de crear una que sea segura para los pacientes, sin afectar su efectividad terapéutica, con lo que actualmente ha sido reemplazada por formulaciones asociadas a lípidos que han intentado mejorar la solubilidad de las moléculas apolares de anfotericina B convencional. Tres productos a base de lípidos están disponibles actualmente: La anfotericina B dispersión coloidal, anfotericina B liposomal y anfotericina B complejo lipídico.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar, de forma comparativa, la incidencia de diferentes formulaciones de Anfotericina B sobre la seguridad del paciente. Para ello, se procedió a: 1. Describir diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de la Anfotericina B desoxicolato y anfotericina B en sus formas lipídicas; 2. Comparar las reacciones adversas de anfotericina

B desoxicolato, anfotericina B lipídica y anfotericina B liposomal a nivel renal, hematológico y las dependientes de la infusión durante el tratamiento; 3. Comparar las formulaciones de anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipídica y anfotericina B liposomal; 4. Evaluar los parámetros críticos en el proceso de manufactura de Anfotericina B liposomal que garanticen la reproducibilidad y seguridad de la misma.

Materiales y métodos

Métodos

La investigación es tipo descriptiva debido a que busca detallar las características de las formulaciones de Anfotericina B convencional y Anfotericina B en sus formas lipídicas para establecer comparaciones y definir cuál es la más segura y eficaz. El diseño de investigación utilizado es de tipo documental, ya que se fundamenta en seleccionar diversas fuentes primarias con referencia a las formulaciones de distintos tipos de Anfotericina B, destacando sus diferencias estructurales, tecnológicas, reacciones adversas, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas para de esta manera poder establecer conclusiones acerca de la seguridad y eficacia en cada caso.

Se seleccionaron ocho trabajos experimentales para realizar el análisis comparativo de la incidencia sobre la seguridad del paciente con las diferentes formulaciones de Anfotericina B, los cuales se indican a continuación.

1. Anfotericina B desoxicolato versus anfotericina B liposomal: efectos sobre la función renal (Botero y Restrepo, 2015).

2. Distribución tisular de anfotericina B en material de autopsia después del tratamiento con anfotericina B liposomal y dispersión coloidal de anfotericina B. Vogelsinger y col., 2006).
3. Análisis comparativo de seguridad entre anfotericina B convencional y anfotericina B complejo lipídico en pacientes del hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período 2011-2012 (Espinoza, 2014).
4. Formulaciones liposolubles de anfotericina B versus anfotericina B en pacientes oncológicos con neutropenia (Johansen y Gøtzsche, 2017).
5. Toxicidades hematológicas asociadas con las formulaciones de Anfotericina (Falci y col., 2015).
6. Comparación entre formulaciones liposomales de anfotericina B (Adrel-Moore y col., 2016).
7. Optimización del proceso de manufactura de complejos liposomales de anfotericina B usando el enfoque de calidad por diseño (Liu y col., 2020).
8. Parámetros críticos en el proceso de manufactura de formulaciones liposomales de anfotericina B (Rivnay y col., 2019).

Resultados

La anfotericina B convencional se ha utilizado como tratamiento estándar para infecciones fúngicas invasivas, sin embargo, presenta diversas reacciones adversas,

entre ellas, lesión renal. Se han desarrollado nuevas formulaciones de anfotericina B asociadas a lípidos, que presentan un mejor perfil de seguridad. Botero y Restrepo, 2015, evaluaron los efectos de la anfotericina B convencional y anfotericina B liposomal en la función renal.

Los hallazgos indican que la anfotericina liposomal B fue significativamente más segura que la anfotericina B convencional en términos de aumento de creatinina sérica. Además, hubo una disminución significativa en todas las reacciones relacionadas con la infusión en el grupo liposomal en comparación con el grupo convencional: fiebre 32%; escalofríos 75%; fiebre y/o rigores 58%; náuseas 0 % y vómitos 61 % (Botero y Restrepo, 2015).

Las formulaciones lipídicas de la anfotericina B muestran diferencias notables en su farmacocinética plasmática, las cuales pueden atribuirse a la diversidad fisicoquímica de las fracciones lipídicas.

Vogelsinger y col., 2006 determinaron concentraciones tisulares de anfotericina B en material de autopsia de pacientes con una infección fúngica invasiva sospechosa o comprobada, tratados con anfotericina B liposomal o anfotericina B en dispersión coloidal. Encontraron que, las concentraciones más altas de anfotericina B se estaban presentes en el hígado y el bazo y en menor proporción en riñón, pulmón, miocardio y tejido cerebral. Los resultados obtenidos en el tejido hepático fueron $102,81 \pm 68,72 \mu\text{g/g}$, en el grupo de pacientes evaluados con anfotericina B liposomal y $94,42 \pm 60,17 \mu\text{g/g}$ en el grupo de anfotericina B dispersión coloidal. Con respecto a las concentraciones reportadas en el bazo son $60,32 \pm 29,75 \mu\text{g/g}$ y $81,34 \pm 57,97 \mu\text{g/g}$, respectivamente (Vogelsinger y col., 2006).

La anfotericina B (AnB) liposomal tiene un perfil farmacocinético significativamente diferente al de las presentaciones convencionales. En la Tabla I se ilustran los parámetros farmacocinéticos más significativos de las diferentes formulaciones de la AnB a las dosis de administración más frecuentes. Estos valores están basados en las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de AnB total en humanos tras la administración de dosis múltiples por vía endovenosa (Espinoza, 2014).

Como se puede apreciar en la Figura 1, no se encontraron diferencias significativas en la presencia de reacciones adversas a nivel de perfil hematológico y hepático entre los pacientes que utilizaron AmB y ABCL.

Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticas significativas a favor de ABCL en el incremento de creatinina sérica (valor-p = 0,009) y en la probabilidad de incremento de esta al 20% a las dos semanas de tratamiento.

Al comparar la AmBisome vs. Anfotericina B convencional, la forma liposomal resultó en una disminución de la incidencia de nefrotoxicidad definida como un aumento del 100% en creatinina sérica, comparada con la anfotericina B convencional, además, reportó menos reacciones adversas relacionadas con la infusión.

Por otro lado, los pacientes tratados con dispersión coloidal de anfotericina B (ABCD) experimentaron significativamente menos nefrotoxicidad que aquellos a los que se administró anfotericina B convencional. Hubo más reacciones relacionadas con la infusión y más casos de eventos hipóxicos con ABCD.

Tabla I.

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formas farmacéuticas de Anfotericina B vía administración endovenosa

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formas farmacéuticas de Anfotericina B vía administración endovenosa.						
Forma farmacéutica	Dosis	Parámetros				
	mg/kg/día	Cmax (µg/mL)	ABC (µg*h/mL)	Vd (L/kg)	t 1/2 (h)	Cl (mL/h/kg)
Anfotericina B desoxicolato	0.6 - 1	1.1 - 1.8 ± 0.2	17.1 - 18.6 ± 5	2.7 - 5 ± 2.8	24 - 27 ± 10	38 - 39.9 ± 15
Anfotericina B complejo lipídico	5	1.7 ± 0.8	14 ± 7	131 ± 7.7	380 ± 486	436 ± 188.5
Anfotericina B dispersión coloidal	4 - 5	2.9 - 3.1	36 - 43	4.1 - 4.3	27 - 28.2	117 - 125
Anfotericina B liposomal	2.8 - 5	48 - 83 ± 35.2	466 - 555 ± 171	0.09 - 0.11 ± 0.06	8.6 - 8.7 ± 3.1	6.7 - 11 ± 4

Cmax: Concentración máxima; ABC: Área bajo la curva; Vd: Volumen de distribución; t 1/2: tiempo de vida media; Cl: Aclaramiento total de creatinina . (Espinoza, 2014).

En cuanto a los pacientes tratados con complejo lipídico de anfotericina B (ABLC) experimentaron significativamente menos nefrotoxicidad y menos abandonos a la terapia que aquellos a los que se le administró la forma convencional de anfotericina B, así como una menor expresión de efectos adversos por infusión (Johansen y Gøtzsche, 2017).

La anemia es un evento adverso bien descrito relacionado con el uso de anfotericina B (AmB). Hasta una cuarta parte de los pacientes que reciben este medicamento desarrollan anemia, y la frecuencia de esta complicación puede llegar al 95% si se usa AmB por más de 30 días. Además de anemia, también se han descrito la leucopenia y trombocitopenia en pacientes que reciben AmB. Sin embargo, estos efectos parecen ser menos frecuentes en comparación a la anemia. Al respecto, Falci y col. (2015), en un estudio de cohorte retrospectiva, evaluaron la incidencia y predictores de toxicidad hematológica en pacientes tratados con diferentes formulaciones de anfotericina B: anfotericina B desoxicolato (d-AmB), anfotericina B liposomal (L-AmB) y complejo lipídico de anfotericina B (ABLC).

Los hallazgos demostraron que se produjo anemia grave en casi una cuarta parte de los pacientes tratados con L-AmB (16,8%), en comparación con los pacientes tratados con d-AmB (25,4%) y ABLC (30,2%). Además, la terapia con L-AmB resultó en una menor reducción en los niveles de hemoglobina (13,3%), en comparación con el tratamiento de d-AmB (29,6%) y ABLC (23,8%). De esta manera, se puede afirmar que la formulación de L-AmB

Reacción Adversa al Medicamento	Medicamento		Significancia	
	AmB (% de RAMs)	ABCL (% de RAMs)		
<i>Perfil Sanguíneo</i>	Disminución de Hemoglobina	5/35 (14.3%)	1/9 (11.1%)	1.0*
	Disminución de Neutrófilos	1/35 (2.9%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Disminución de Linfocitos	6/35 (17.2%)	0/9 (0.0%)	0.428*
	Disminución de Plaquetas	2/35 (5.8%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Total [†]	12/35 (34.3%)	1/9 (11.1%)	0.342*
<i>Perfil Renal</i>	Aumento de Creatinina	6/64 (9.4%)	0/20 (0%)	0.356*
	Disminución de Potasio	39/63 (61.9%)	10/21 (47.6%)	0.371*
	Disminución de Magnesio	0/60 (0.0%)	1/12 (8.3%)	0.368*
	Disminución de Calcio	9/59 (15.3%)	2/13 (15.4%)	1.0*
	Disminución de Fósforo	10/51 (19.6%)	2/11 (18.2%)	1.0*
	Total [†]	34/48 (70.8%)	8/11 (72.7%)	1.0*
<i>Perfil Hepático</i>	Aumento de Bilirrubina Total	6/52 (11.5%)	1/11 (9.1%)	1.0*
	Aumento de ALT	2/53 (3.8%)	1/9 (11.1%)	0.914*
	Aumento de AST	1/53 (1.9%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Aumento de Fosfatasa Alcalina	1/49 (2.0%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Total [†]	7/46 (15.2%)	2/8 (25.0%)	0.864*

Figura 1. Reacciones adversas durante el tratamiento con Anfotericina B desoxicolato (AmB) y Anfotericina B Complejo Lipídico (ABCL)

tiene menor incidencia en efectos adversos relacionados con anemia con respecto a las otras formulaciones evaluadas.

En relación con la Leucopenia, los pacientes en el grupo ABLC experimentaron una tendencia hacia una mayor frecuencia de leucopenia severa (13,8%) que los pacientes con tratamiento de L-AmB (5,6%), d-AmB (6,0%). Por consiguiente, se puede decir que, aunque la forma liposomal no es la de elección en caso de riesgos de leucopenia, si lo es la forma del complejo lipídico con respecto a la convencional. Finalmente, en el caso de trombocitopenia se observaron diferencias considerables de trombocitopenia grave entre los grupos con tratamiento de ABLC (21,8%), L-AmB (13,6%), d-AmB (15,9%). Siendo así, el de elección el complejo lipídico en comparación con las otras formulaciones (Falci y col., 2015).

Debido al éxito comercial y la eficacia clínica de los productos lipídicos de anfotericina B, se comenzó a elaborar formulaciones genéricas de anfotericina B liposomal. Sin embargo, existe la preocupación de que los productos genéricos pueden no ser bioequivalentes al producto original, lo que da como resultado diferentes niveles de eficacia y tolerabilidad. Esto tiene una relevancia clínica particular para los productos de anfotericina B liposomal dada la toxicidad del agente activo. En ese sentido, Adler-Moore y col., 2016 realizaron una comparación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las diversas formulaciones liposomales de anfotericina B.

Se evaluaron diferentes formulaciones a saber: AmBisome (*Australian Government Department of Health, Therapeutic Goods Administration*), Lambin (Olson et al., Med

Mycol 2015), Lipholyn (Product inserts for Ambihope (Abbott India Ltd., 2013) and Lipholyn (Lyka Labs, 2013), Ampholip (Pharmaris,; <http://pharmarisperu.com/en-linea-bharat-serums-and-vaccines.php>) y Fungisome (Romero y Morilla, Expert Opin Drug Deliv 2008).

Se sabe que la eficacia y seguridad de cualquier producto de AmB liposomal se determina principalmente por la velocidad y el grado de liberación de AmB de los liposomas después de su administración. Para AmBisome existen varios atributos fisicoquímicos que han contribuido a su índice terapéutico favorable. Primero, el tamaño pequeño de estos liposomas (< 100 nm) que da como resultado una circulación prolongada que permite la distribución en muchos órganos diferentes. En segundo lugar, su composición asegura que la AmB permanezca asociada con la bicapa de los liposomas hasta su contacto con el hongo, minimizando los efectos adversos de la AmB en los tejidos del huésped. Para ello, estos liposomas están compuestos por colesterol que se une a la AmB, así como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG) que son estables en el organismo a 37°C.

Efectivamente, los hallazgos mostraron que la forma de AmBisome contribuye a menores efectos con respecto a las otras formas comerciales debido a un menor tamaño de partícula. En la Figura 2, se puede apreciar mediante estudios preclínicos AmBisome con otros dos productos AmB liposomales, Anfogen® (Genpharma, S.A., Argentina) y Lambin® (Sun Pharmaceutical Industries Ltd.) que tienen la misma composición química que AmBisome. AmBisome era notablemente menor (30– 36%) que los otros dos agentes.

	AmBisome vs Anfogen [1]		AmBisome vs Lambin [2]	
	AmBisome	Anfogen	AmBisome	Lambin
Median diameter of liposomes (nm)	77.8	111.5	77.8	122.2
RBC toxicity (K ₅₀ µg/ml)	20	0.9	7.4	1.4
Maximum tolerated single iv dose (mg/kg)	>100	10	>50	20
BUN at 7.5 mg/kg	12 (normal)	78	NL	NL
Renal tubular necrosis with daily 5 mg/kg dosing in uninfected mice	Normal renal tubules	Renal tubular dilation	Normal renal tubules	Renal tubular dilation
Survival following <i>A. fumigatus</i> challenge and drug treatment	7.5 mg/kg, 4X: 100%	7.5 mg/kg, 4X: 70%	10 mg/kg, 6X: 60%	10 mg/kg, 6X: 30%

Abbreviations: RBC: red blood cell, iv: intravenous, BUN: blood urea nitrogen, NL: within normal limits.

Figura 2. Resultados de estudios preclínicos que comparan AmBisome con Anfogen o Lambin

Con las pruebas *in vivo*, AmBisome también fue significativamente menos tóxico en base a la dosificación intravenosa única de DL₅₀ y con la dosificación diaria, hubo significativamente menos necrosis tubular renal. Los resultados muestran que las diferencias en las condiciones de procesamiento con productos que tienen la misma composición química pueden tener un efecto importante en las características funcionales del principio activo.

Para concluir, este estudio ha demostrado que la comparación de productos de anfotericina B liposomal con composiciones químicas diferentes o iguales, usando diferentes métodos de producción, variará en tamaño y tendrá toxicidades significativamente diferentes *in vitro* e *in vivo* junto con una eficacia reducida. Estos resultados subrayan la importancia de establecer pruebas de bioequivalencia adecuadas para los productos de liposomas para garantizar la uniformidad de su índice terapéutico (Adler-Moore y col., 2016).

Diferentes estudios demuestran que la eficacia del producto y sus propiedades son afectadas significativamente por los ingredientes en la fórmula, así como la técnica de manufactura, por lo que se hace énfasis en evaluar los procesos que se llevan

a cabo en la elaboración de liposomas de anfotericina B. Liu y col. (2020) optimizaron el proceso de fabricación de un producto complejo de anfotericina B liposomal (AmB) mediante el enfoque de calidad por diseño (QbD), dividiéndolos en 4 etapas: mezcla orgánica, secado, hidratación y formación de liposomas, finalmente liofilización. El proceso se basó en la formación asistida por ácido de complejos fármaco-lípidos en una mezcla de metanol-cloroformo (paso I), seguido de secado por aspersion (paso II), hidratación y formación de liposomas por microfluidización (paso III) y liofilización (paso IV).

Los estudios de Liu y col., 2020 demostraron que la eficacia y las propiedades del fármaco eran significativas, y que se afectan significativamente por los ingredientes de la formulación y el proceso fabricación. Al evaluar la influencia de parámetros críticos de la formulación y de los parámetros del proceso de fabricación se identificaron atributos críticos de calidad de un producto farmacológico liposomal AmB complejo. Se observó que la variable más importante fue la temperatura de curado aplicada durante la hidratación y el proceso de microfluidización. El parámetro de formulación de PG:PL y API:PL tuvo un alto impacto, lo que indica la importancia

del proceso de mezcla orgánica. La temperatura de calentamiento durante el secado fue una variable menos importante en el proceso de liofilización.

Ahora bien, identificar un producto farmacéutico complejo y el impacto asociado en los atributos críticos de calidad es esencial para el desarrollo y control de calidad de medicamentos nuevos y genéricos. Rivnay y col. (2019) estudiaron los enfoques de producción de varios pasos y las condiciones de fabricación relacionadas que pueden afectar las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas esenciales del producto farmacéutico final del AmBisome, el antibiótico macrólido de anfotericina B liposomal (AmB) ampliamente adoptado como un producto farmacológico antimicótico. El desafío clave en la fabricación y el análisis de AmB liposomal fue debido a la propensión del fármaco a agregarse, con la baja solubilidad asociada en agua y solventes orgánicos.

Se definieron los parámetros críticos en el proceso de manufactura de liposomas de anfotericina B y se asociaron directamente a un atributo del producto, basados en las 4 etapas: donde en la etapa I consistió en la acidificación adecuada durante la formación de los complejos fármaco-lípido que es condicionante de la calidad al afectar directamente la solubilidad o degradación del principio activo; la etapa II se identifica la temperatura ideal para el proceso con el fin de controlar el tamaño y formación de las partículas liposomales; y la etapa III, la rápida congelación durante la liofilización la cual es crucial para evitar la agregación y aumento del tamaño de los liposomas (Rivnay y col., 2019).

Discusión y Conclusiones

En el uso clínico de la Anfotericina B desoxicolato presenta reacciones adversas agudas relacionadas con la infusión (náuseas, vómitos, escalofríos, fiebre, hipertensión o hipotensión e hipoxia) e importante nefrotoxicidad que a menudo impiden la administración de un ciclo completo o dosis suficientes del medicamento.

Esta situación ha generado en la industria farmacéutica la necesidad de buscar otras tecnologías farmacéuticas al momento de elaborar la anfotericina B y surgieron formulaciones lipídicas que tenían la premisa de ayudar a reducir considerablemente los efectos adversos.

La anfotericina B liposomal presente en el plasma libera lentamente el principio activo dirigiéndose de forma directa hacia los tejidos y el objetivo fúngico a través de la absorción. Mecanismo que no ocurre con las otras formas de Anfotericina B ya que se encuentran libre en sangre y son filtradas a nivel renal, causando daño en las células tubulares renales, favoreciendo a la disminución de la producción de eritropoyetina y alterando también los niveles de hemoglobina, observándose anemia y leucopenia en algunos pacientes.

En cuanto a las reacciones adversas relacionadas con la infusión se observa que el porcentaje de los pacientes con una reacción adversa después de la primera infusión con la forma liposomal fue de 17% vs. 44% para fiebre, y 18% vs. 54% para escalofríos, estos datos con respecto a la forma convencional de anfotericina B (Adler-Moore y col., 2016).

En general las tres diferentes formulaciones solubles en lípidos de anfotericina B se asociaron con un mejor perfil de seguridad para el paciente que la anfotericina B convencional; sin embargo, también existen diferencias significativas dentro de las diferentes formulaciones solubles en lípidos, las cuales se pueden apreciar en la Tabla II.

Debido al mayor tiempo de residencia de los pequeños liposomas bilaminares de anfotericina B liposomal, los niveles de anfotericina B en plasma son mucho más altos en pacientes en tratamiento con anfotericina B liposomal que en aquellos tratados con otras formulaciones de anfotericina. Las partículas más grandes encontradas en las otras formulaciones de anfotericina B, como en la forma coloidal o complejo lipídico son absorbidas rápidamente por los tejidos periféricos, particularmente por las células del sistema reticuloendotelial, aumentando la toxicidad en dichos tejidos. La evidencia expuesta indica que la forma liposomal de anfotericina B es la que presenta un mejor perfil de seguridad y efectividad para el paciente.

Los liposomas tienen la capacidad de transportar fármacos hidrofílicos y lipofílicos. Las sustancias polares o de bajo peso molecular pueden ser agrupadas en el compartimiento acuoso, mientras que las estructuras no polares se intercalan entre las bicapas lipídicas. De esta forma, la versatilidad de los liposomas proporciona gran ayuda en la terapia con fármacos como la Anfotericina B (Botero y col., 2014).

Asimismo, el principio activo tiene la capacidad de prolongar su tiempo de vida media y con él su efecto terapéutico dentro del organismo. También, mejora su absorción, penetración y difusión, al mismo tiempo que estabiliza el principio activo y ofrece una mayor protección contra la oxidación. Además, presenta lípidos que le confieren mayor afinidad a células específicas dentro del organismo. La adición de polímeros ha demostrado un incremento en la biocompatibilidad y control en los perfiles de degradación de la nanoestructura. La finalidad de estas modificaciones permite alcanzar las concentraciones de fármaco requeridas para una mayor eficacia terapéutica en el

Tabla II.

Características de las formulaciones de administración endovenosa de la AnB

Formulación	Formulación Esterol/Lípido	Estructura	Tamaño de partícula	Estabilidad
AnB convencional (AnB-C)	No aplica	Micelas	<10 µm	1 semana de 2-8°C o 24 horas a 27°C
AnB en complejo lipídico (ABCL)	Ninguno / DMPC & DMPG (7:3)*	Discos complejos	1.6-11.1µm (90% de partículas 1.6-6 µm)	15 horas a 2-8°C o 6 horas a 27°C
AnB en dispersión coloidal (ABDC)	Sulfato de colesterol / Ninguno	Cintas	115 nm de diámetro, 4 nm de espesor	24 horas de 2-8°C
AnB en liposomas (AnB-L)	Sulfato de colesterol (5)* EPC & DSPG (10:4)*	Vesículas unilamelares	45-80 nm de diámetro	24 horas de 2-8°C

EPC, Fosfatidilcolina de huevo; DSPG, Diestearoil fosfatidil glicerol; DMPC, Dimiristoil fosfatidilcolina; DMPG, Dimiristoil forfatidilglicerol, ND, No se tiene data.

*Tasa Molar de cada componente, respectivamente (Chapman y col., 2003).

sitio diana y, al mismo tiempo, minimizan los efectos adversos sobre células y tejidos sanos.

Se han comercializado diferentes productos de anfotericina B liposomal en Europa y América del Norte, como el reconocido Ambisome (Gardor), Ambihope (*Abbott Healthcare Pvt. Ltd.*), Ambilip, Amphotin, y Amphotin-LIP (United Biotech), Lambin (*Sun Pharmaceutical Industries Ltd.*) o Lypholyn (Lyka Labs Ltd.); algunos de estos productos tienen la misma composición química (p. ej., AmBisome, AmBiL y Lambin), pero los estudios han demostrado que esto no necesariamente se traducen en igual eficacia y seguridad, lo que sugiere que los diferentes procesos de fabricación pueden alterar las propiedades del producto final (Adler-Moore y col., 2016).

Como medicamento innovador, está AmBisome cuya toxicidad reducida depende de un proceso de fabricación complejo, cuidadosamente controlado y preciso, de varios pasos, que es necesario para garantizar la uniformidad del producto lote a lote. Los ensayos de control de calidad para AmBisome incluyen:

- Pruebas químicas (análisis HPLC).
- Físicas (tamaño de partículas, ausencia de floculación y agregación con el tiempo, estabilidad a diferentes temperaturas).
- Biológicas (actividad *in vitro* contra diferentes hongos, toxicidad *in vivo* a dosis crecientes).

Los estudios han demostrado que incluso alteraciones menores en la relación molar de AmB o fosfolípidos, los cambios en la longitud de la cadena de ácidos grasos

de fosfolípidos, o el tamaño y la carga de los liposomas pueden afectar la asociación entre AmB y la bicapa liposómica, alterando la toxicidad del producto.

Además de los componentes reales de los liposomas, el método utilizado para hacer los liposomas también afectará su toxicidad. Por ejemplo, se encontraron liposomas formados por sonicación que muestran ser más tóxicos para los ratones que los producidos por homogeneización, a pesar de que los liposomas tienen la misma relación molar de lípidos. Otros estudios han demostrado que diversas tensiones en los liposomas, como la filtración estéril durante la producción, la filtración antes del uso, los requisitos de refrigeración y las condiciones de liofilización pueden provocar floculación, fugas del fármaco, la separación de fases y la desintegración de los liposomas (López, 2000).

Dadas las diferencias en toxicidad y eficacia entre los diferentes productos liposomales de AmB y el impacto que estas diferencias pueden tener en la calidad de la atención y la seguridad del paciente, es necesario distinguir entre estos productos tanto en la literatura publicada como en su uso clínico. Para abordar este problema, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) publicó su primer borrador "Guía para la industria sobre fármacos liposomados", en agosto de 2002, y este borrador todavía está bajo revisión (*Draft Guidance for Industry on Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation; Availability*); a su vez la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) estableció que una formulación liposomal debe mostrar equivalencia con el producto innovador en términos de

calidad farmacéutica, farmacocinética y farmacodinámica. Este enfoque a nivel regulatorio es necesario para brindar seguridad a los médicos y pacientes que están recibiendo un tratamiento eficaz y droga segura (https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_es.pdf)

En consecuencia, cada cambio realizado en el proceso de fabricación deberá ser evaluado minuciosamente estableciendo parámetros críticos que permitan la reproducibilidad de las características del fármaco innovador.

Las bicapas de liposomas tienden a volverse más permeables a su temperatura de transición o por encima de ella y, por lo tanto, liberan su contenido. El colesterol se puede mezclar con fosfolípidos, y los liposomas de esta forma son menos propensos a liberar su contenido interno. Partiendo de estos principios, los liposomas deben ser formulados con fosfolípidos con temperaturas de transición superiores a 37°C, además de tener una fracción molar alta de colesterol en su composición.

El tipo y calidad de los excipientes juega un papel vital en el desarrollo y optimización de los parámetros del proceso de manufactura (Tabla III). AmBisome presenta en su fórmula fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y diastearoil fosfatidilglicerol (DSPG), ambos tienen altas temperaturas de transición y se utilizaron además del colesterol, para obtener una formulación estable a 37°C. Por otro lado, la carga negativa en el DSPG interactúa con el grupo amino positivo de anfotericina B, formando un complejo anfotericina B y DSPG en la bicapa de liposomas. Finalmente, estos liposomas se unen a

Tabla III.

Descripción de los componentes de la forma liposomal de Anfotericina B “Ambisome” y su justificación

Componente	Justificación en la fórmula
Anfotericina B	Principio activo con acción antifúngica
Sacarosa	Crioprotector
Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada (HSPC)	Fosfolípido de membrana
Diastearoil Fosfatidilglicerol (DSPG)	Fosfolípido de membrana
Colesterol	Emulsificante
Alfa-tocoferol	Solvente para medicamentos poco solubles, altamente lipofílico.
Succinato Disódico Hexahidrato	Regulador y estabilizador del pH, dado que los tampones succinatos como excipientes causan menos dolor en el lugar de la inyección.

Fuente: Realizado por los autores

las paredes celulares fúngicas, seguido de su tránsito a través de la pared celular fúngica para permitir que la AmB se dirija al ergosterol en la membrana celular fúngica (Adler-Moore y col., 2016).

Para lograr un monitoreo adecuado de las diferentes variables que puedan afectar la calidad del producto es necesario conocer la técnica de manufactura básica para formulación de liposomas de Anfotericina B y establecer los parámetros críticos en el proceso, para esto se toma como referencia el proceso descrito por Liu y col., (2020) (Figura 4).

Los parámetros críticos de proceso y sus controles de proceso asociados son cruciales para el desarrollo de fármacos y la validación del proceso del mismo.

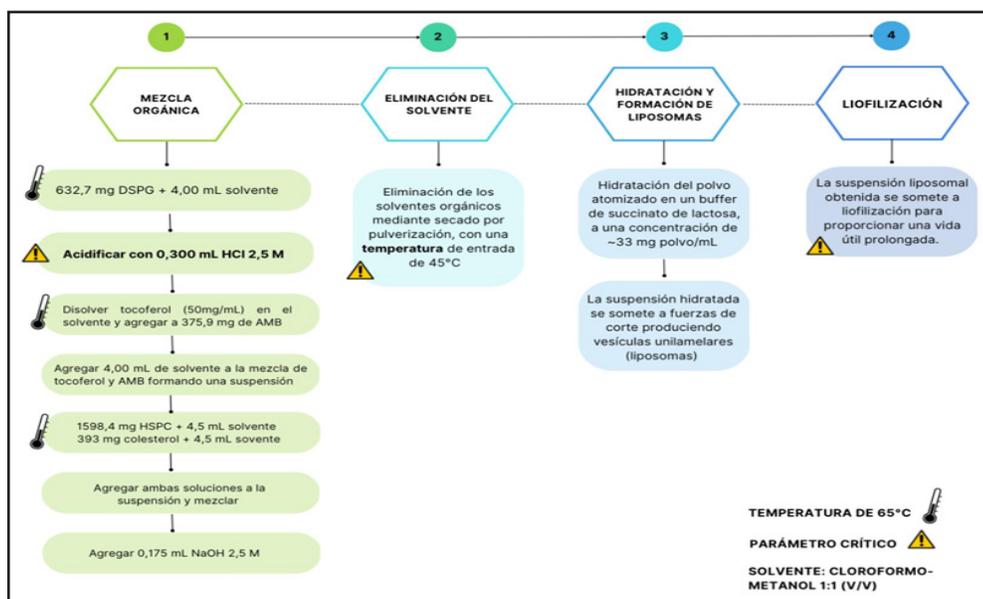


Figura 4. Diagrama del proceso de manufactura de AmBisome.

Fuente: realizado por los autores

Cualquier falla para controlar el proceso puede resultar en dificultades con los sometimientos regulatorios y la liberación de un lote. Una carencia de controles eficientes también puede llevar a extensa pérdida de producto y una pérdida de la confianza regulatoria y del cliente, por lo que estudiar e identificar parámetros críticos resulta de gran interés al momento de la manufactura.

Así, se describen las etapas de manufactura cruciales:

ETAPA I. La etapa de acidificación resulta crucial para el proceso, ya que un medio excesivamente ácido conduce a una rápida degradación del fármaco, mientras que la acidificación insuficiente impide la solubilización completa de la Anfotericina B y la posterior formación de los complejos solubles de fármaco-lípido.

Esto se debe al requerimiento de un complejo neutro de "DSPG-Na⁺" para solubilizar el fármaco y como en

la formulación existe una proporción 1: 2 de AmB y DSPG, respectivamente, el medio requiere un pH ácido. Cuando la concentración de protones supera el equivalente de las especies de DSPG-Na⁺, el complejo formado adquiere carga positiva y la fracción de exceso de HCl queda libre para degradar la AmB. Mientras que, si el medio no es suficientemente ácido, no se genera el complejo neutro "DSPG-Na⁺" que confiere la integración de la AmB al liposoma.

ETAPA II. El tratamiento térmico de forma prolongada a una temperatura de 65°C, justo por encima de la temperatura de transición de la fase lipídica, resulta un factor crítico debido al mantenimiento de una fase líquida de los fosfolípidos y la correcta reorganización estructural de la AmB en la bicapa de la membrana liposomal.

El aumento de la temperatura permite una integración estructural con el resto de los agregados, asegurando su correcto

empaquetamiento y reduciendo la posibilidad de presentar la forma libre de AmB dentro de la formulación.

ETAPA III. Otro factor crítico presente en el proceso de fabricación de liposomas se manifiesta durante el ciclo de liofilización debido a la temperatura que mantiene el producto durante el secado. El proceso de congelación debe ser relativamente rápido para evitar un cambio en el tamaño de las partículas.

Los tamaños de los liposomas oscilan entre 80 y 200 nm y si el proceso de congelación es gradual durante 40 - 60 min, existe un reordenamiento estructural que confiere tamaños de liposomas mucho mayores (1.140nm)

Tal y como se ha podido identificar en la exhaustiva comparación realizada entre las diferentes formas de Anfotericina B, las nuevas tecnologías que permiten encapsulación del principio a través de liposomas trae al paciente grandes beneficios en torno a la seguridad y efectividad; sin embargo el simple hecho de realizar un liposoma no asegura que el mismo posea características ideales, por lo que es de gran importancia lograr identificar y controlar los parámetros críticos de proceso de manufactura que permitan asegurar la reproducibilidad lote a lote y la obtención de un producto de calidad que brinde seguridad y eficacia desde el momento de su desarrollo hasta el instante de la administración directa al paciente (Rivnay y col., 2019).

Recomendaciones

La ciencia ha vivido en las dos últimas décadas una nueva revolución, el paradigma "nano", representado por dos disciplinas nuevas denominadas

nanociencia y nanotecnología. Se basan en el desarrollo de métodos de fabricación precisos y reproducibles para la obtención de estructuras cada vez más pequeñas y que se aplican en una variedad de sectores, como en el farmacéutico con la aparición de los liposomas.

Se insta a la comunidad educativa mantenerse en constante investigación y actualización de programas académicos con las nuevas tecnologías y herramientas disponibles que permiten diseñar sistemas biocompatibles, capaces de transportar y entregar sustancias terapéuticamente activas (drug delivery), en forma específica, hasta el sitio donde deben ejercer su acción. Esta especificidad es fundamental para reducir las dosis y disminuir o, incluso, eliminar los efectos colaterales indeseados, generalmente asociados a la toxicidad de las sustancias respecto de los tejidos sanos.

Por lo que es de gran importancia que desde la academia se siga apostando por el avance y evolución de esta nueva generación de medicamentos que se está desarrollando a partir de la aplicación de la nanotecnología en el campo farmacéutico.

Además, desde el punto de vista metodológico se recomienda realizar estudios experimentales de fabricación de liposomas, tomando en cuenta la aplicación de las distintas técnicas de manufacturas mencionadas en el transcurso de esta investigación con sus respectivos parámetros críticos, con el fin de lograr la caracterización de los mismos y evaluar la calidad según cada método empleado.

Referencias bibliográficas

- Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. 2016. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Medical Mycology* 54(3):223-231.

- Alcántara MR. 2010. La importancia de los hongos. *El ecologista* 66.
- Botero JP, Restrepo A. 2015. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. *Cochrane Library* (11):1-51.
- Botero MC, Puentes-Herrera M, Cortés JA. 2014. Formas lipídicas de anfotericina. *Rev Chil Infectol* 31(5): 518-527.
- Chapman SW, Cleary JD, Rogers PD. 2003. Amphotericin B. En Dismukes WE, Pappas PG y Sobel JD. *Clinical Mycology*. USA. Oxford University Press. 33-48.
- Espinoza C. Análisis comparativo de seguridad entre anfotericina B convencional y anfotericina B complejo lipídico en pacientes del hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período 2011-2012. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Perú, 2014.
- Falci D, da Rosa F, Pasqualotto A. 2015. Hematological toxicities associated with amphotericin B formulations Leukemia & Lymphoma Early Online: 1-6 (1):1-6.
- Gregorí B. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia* 39(2):1-15.
- FDA (Food Drug Administration), Draft Guidance for Industry on Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation; Availability. 2022. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> or <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/default.htm>.
- Liu H, Rivnay B, Avery, K Hye Myung J, Kozak D, Landrau N, Nivorozhkin A, Ashraf M, Yoon S. 2020. Optimization of the manufacturing process of a complex amphotericin B liposomal formulation using quality by design approach. *International J Pharmaceutics* 585:119473.
- Johansen H, Gøtzsche P. 2017. Amphotericin B lipid soluble formulations versus amphotericin B in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Library* (3):1-28.
- López R. 2000. Anfotericina B: Determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación de estudios farmacocinéticos y de estabilidad química. [Tesis doctoral]. Barcelona; Unidad de Monitorización de Fármacos del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona. Disponible: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/3459#page=1>.
- Pemán J, Salavert M. 2012. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Micología Clínica* 30 (2):90-98.
- Rivera E. 2020. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de Facultad de Medicina UNAM* 63 (2): 7-17.
- Rivnay B, Wakim J, Avery K, Petrochenko P, Myung JH, Kozak D, Yoon S, Landrau N, Nivorozhkin A. 2019. Critical process parameters in manufacturing of liposomal formulations of amphotericin B. *International J Pharmaceutics* 565: 447-457.
- Suberviola B. 2022. Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. *Revista Iberoamericana de Micología* 38(2):56-60.
- Vogelsinger H, Weiler S, Djanani A, Kountchev J, Bellmann R, Wiedermann C, Bellmann R. 2006. Amphotericin B tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion. *J Antimicrob Chemother* (57):1153-1160.
- Olson JA, Schwartz JA, Hahka D, Nguyen N, Bunch T, Jensen GM, Adler-Moore JP. 2015. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol* 53:107-118.
- Romero EL, Morilla MJ. 2008. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin Drug Deliv* 5(7):805-23.



Optimización y validación de un método por RP-HPLC para determinación simultánea de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína en tabletas

Optimization and validation of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of dequalinium chloride and lidocaine hydrochloride in tablets

ANDREA C. GARCÍA RANAUDO^{*1}, REEM MOHAMMAD ABDULKHALIK²,
ANDREA R. ROJAS SEMINARIO³, MARISABEL BOR⁴

Resumen

La combinación de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína es empleada como antiséptico bucofaríngeo en forma de tabletas masticables, específicamente para la profilaxis y tratamiento de afecciones mucosas superficiales. Actualmente, no existe un método analítico validado reportado en la literatura que permita determinar simultáneamente esta combinación de principios activos, por ello se optimizó y validó un método por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC), de acuerdo con los requerimientos establecidos por la USP en el Apartado <1225>. Las condiciones cromatográficas encontradas para la separación y cuantificación de los principios activos fueron: columna octadecilsilano (C18, 10 μm x 3,9 mm x 300 mm), temperatura ambiente, flujo de 1,2 mL/min de una fase móvil constituida por hexanosulfonato de sodio: agua: metanol 2 g :300:700 y pH final de $5,5 \pm 0,2$. El volumen de inyección fue de 20 μL y detección UV a 240 nm. El método resultó ser específico, lineal, exacto y preciso bajo las condiciones de trabajo optimizadas y puede ser empleado como análisis de rutina para la cuantificación simultánea de ambos principios activos.

Palabras clave: Decualinio, lidocaína, validación, optimización, par iónico, RP-HPLC

Abstract

The combination of dequalinium chloride and lidocaine hydrochloride is used in the form of chewable tablets as an oropharyngeal antiseptic, specifically for the prophylaxis and treatment of diseases of superficial mucosa. Currently, there are no validated analytical methods reported in the literature that allows the simultaneous determination of this drug combination, for this reason, a reverse phase high efficiency liquid chromatography (RP-HPLC) method was optimized and validated, according to the requirements established by USP in Section <1225>. The chromatographic conditions found for the separation and quantification of the drugs were: octadecylsilane column (C18, 10 μm x 3.9 mm x 300 mm), room temperature, flow rate of 1.2 mL/min, mobile phase consisting of sodium hexanesulfonate, water, and methanol (2:300:700) with final pH of 5.5 ± 0.2 ; injection volume of 20 μL and UV detection at 240 nm. The method was found to be specific, linear, accurate, and precise under the optimized analytical conditions and can be used as a routine procedure for the simultaneous quantification of both drugs.

Keywords: Dequalinium, lidocaine, validation, optimization, ion pair, RP-HPLC

Laboratorio de análisis de medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

*Correspondencia: andreaagarciar@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0001-9305-8751](https://orcid.org/0000-0001-9305-8751)

² [0000-0001-6006-6915](https://orcid.org/0000-0001-6006-6915)

³ [0000-0003-0149-4615](https://orcid.org/0000-0003-0149-4615)

⁴ [0009-0009-4422-9054](https://orcid.org/0009-0009-4422-9054)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.8)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 02/05/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 70-82. 2023

Introducción

El cloruro de decualinio (dicloruro de 1,1'-decano-1,10-diilbis(4-amino-2-metilquinolinio)decil-2-metil-4-quinolin-1-iumamina) es un potente antiséptico dotado de actividad fungicida y bactericida frente a una gran cantidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Inhibe a baja concentración, el desarrollo de casi todos los gérmenes patógenos causantes de las infecciones comunes bucofaríngeas, empleado para el tratamiento de infecciones locales, siendo un fármaco comúnmente utilizado en forma de tabletas masticables (Bailly, 2021).

En este tipo de formulaciones de uso bucal suelen asociarse dos o más principios activos. Uno de los fármacos que se suele asociar al cloruro de decualinio es la lidocaína (2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida), usualmente en forma de sal hidroc্লórica. La lidocaína es un anestésico local que actúa bloqueando los canales de sodio dependientes de voltaje que impide las corrientes de iones de sodio y potasio a través de los receptores del nervio y por lo tanto, la conducción nerviosa en las neuronas periféricas sensitivas (Ochoa-Anaya y col., 2017).

La asociación de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína en formulaciones sólidas bucales se comercializa en Venezuela sin receta médica y es ampliamente utilizada para el alivio del dolor de garganta, un síntoma frecuente de infecciones virales comunes.

La Farmacopea Europea 10.0 (2019) establece un método cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la determinación de sustancias relacionadas de cloruro de decualinio, que consiste en

el uso de una columna octadecilsilano C18 (0,25 m x 4,6 mm) y una fase móvil compuesta por 2 g de hexanosulfonato de sodio en 300 mL de agua, con ajuste del pH a 4,0 con ácido acético glacial, y 700 mL de metanol. El flujo es de 1,5 mL/min, el volumen de inyección es de 10 μ L y la detección UV se realiza a 240 nm. La preparación de la muestra se realiza disolviendo 10,0 mg de la misma en la fase móvil hasta obtener un volumen final de 10,0 mL.

Actualmente no existe un método analítico validado reportado en la literatura que permita la determinación simultánea de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína en formulaciones farmacéuticas, por ello, en el presente trabajo, se optimizó y validó un método por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC), de acuerdo con los requerimientos establecidos por la USP en el Apartado <1225>, para ser aplicado en la determinación simultánea de ambos principios activos en tabletas masticables.

Materiales y Métodos

EQUIPOS

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Waters® compuesto por bomba modelo 600E, automuestreador plus 717 acoplado a un detector de arreglo de diodos (PDA) modelo 996. Programa Millennium® 32 para la adquisición y procesamiento de datos. Columna C18 Waters® μ Bondapak (10 μ m x 3,9 mm x 300 mm).

Balanzas electrónicas Mettler-Toledo AG245 y OHAUS Adventurer™ AR3130. pHmetro Sper Scientific Bench-Top Meter modelo SP860031, centrifugadora Gemmy Industrial modelo PLC-05.

REACTIVOS

Metanol HPLC Fermont, hexanosulfonato de sodio Kodak, ácido acético glacial Fluka, hidróxido de sodio Merck KgaA, ácido clorhídrico 37% Riedel-de Haën, peróxido de hidrógeno 35% Riedel-de Haën, agua ultrapura 18 M Ω obtenida mediante la combinación de un sistema de pretratamiento y desionización. Ultrapurificador nanopure.

PATRONES DE REFERENCIA

Se emplearon patrones de referencia secundarios provenientes de materias primas de alta pureza: clorhidrato de lidocaína 93,36% y cloruro de decualinio 95,24%, vigentes al momento de la investigación.

MUESTRAS

Producto comercial en forma de tabletas masticables, el cual declara en su composición que cada tableta contiene 0,25 mg de cloruro de decualinio y 5,00 mg de clorhidrato de lidocaína.

PREPARACIÓN DE PATRONES

Se preparó una solución patrón combinada de concentración 0,02 mg/mL de cloruro de decualinio y 0,4 mg/mL de clorhidrato de lidocaína empleando fase móvil como disolvente.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se pesó una cantidad de muestra equivalente a una tableta y se adicionaron

15 mL de fase móvil, seguido de agitación mecánica con vórtex por 30 segundos, ultrasonido por 10 minutos y nuevamente vórtex por 30 segundos. Se llevó a un volumen final de 25,0 mL con fase móvil y posteriormente se centrifugó por 5 minutos. Se transfirió una alícuota de 5,0 mL del sobrenadante a un balón aforado de 10,0 mL y se llevó a volumen con fase móvil. Cada solución fue filtrada a través de una membrana PVDF de 0,22 μ m previo a su inyección en el cromatógrafo.

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La longitud de onda de trabajo se determinó mediante el estudio de espectros de barrido de ambos principios activos en un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm (Figura 1), lo cual fue posible gracias al uso de un detector de arreglo de fotodiodos. Se determinó que ambos analitos absorben a 240 nm, y que al encontrarse cerca de la longitud de onda de máxima absorción del cloruro de decualinio (240 nm) se favorece la señal del mismo sin perjudicar la señal del clorhidrato de lidocaína, permitiendo la cuantificación simultánea de los analitos.

La selección de la fase móvil se llevó a cabo mediante ensayos con diferentes combinaciones propuestas por otras investigaciones para el análisis de uno de los principios activos.

La fase móvil que mostró mejores resultados se compone de 2 g de hexanosulfonato de sodio en 300 mL de

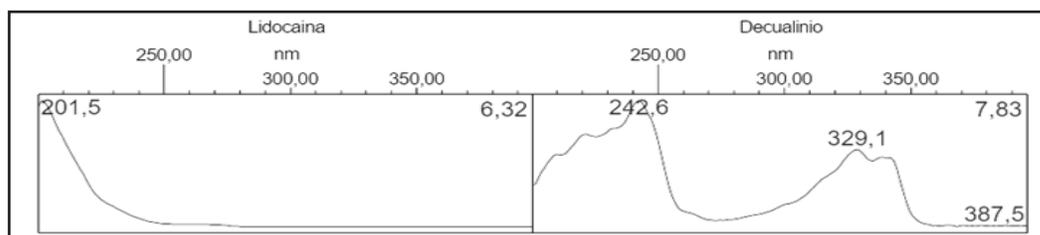


Figura 1. Espectros de absorción UV de clorhidrato de lidocaína (izquierda) y cloruro de decualinio (derecha)

agua, pH ajustado a 4,0 con ácido acético glacial, y 700 mL de metanol. En función a esto se procedió a optimizar y evaluar las condiciones cromatográficas para el análisis.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: Columna C18 Waters® μ Bondapak (10 μ m x 3,9 mm x 300 mm), fase móvil de 2 g de hexanosulfonato de sodio en 300 mL de agua ultrapura con ajuste de pH a 4,0 empleando ácido acético glacial, y 700 mL de metanol; flujo de 1,2 mL/min, volumen de inyección de 20 μ L y detección UV a 240 nm.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La validación del método se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por el Apartado <1225> de la USP 42 (2019) para los procedimientos de Categoría I. Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, especificidad y exactitud.

LINEALIDAD

Se determinó a partir de patrones combinados en un rango de concentración de 0,0030 a 0,0060 mg/mL para el cloruro de decualinio y 0,06 a 0,12 mg/mL para el clorhidrato de lidocaína. Se construyeron curvas de calibración graficando el área del pico obtenido en función a la concentración del analito, y se calculó la ecuación de la regresión lineal para cada analito. La linealidad de las curvas de calibración fue evaluada a través del cálculo del coeficiente de correlación (R) y coeficiente de determinación (R^2).

PRECISIÓN

Precisión del sistema

La precisión del sistema cromatográfico fue estudiada mediante la evaluación de la variación de los valores obtenidos en los tiempos de retención (tR) y áreas de los picos para cada analito, a partir de seis inyecciones consecutivas de un patrón combinado de concentración 0,02 mg/mL de cloruro de decualinio y 0,4 mg/mL para el clorhidrato de lidocaína (nivel 100%).

Repetibilidad

Se evaluó mediante el estudio de las variaciones en la concentración de los analitos a partir de seis determinaciones de muestras preparadas al 100% de concentración, realizado por un analista en un mismo equipo. Para la cuantificación de los analitos se construyó una curva de calibración.

Precisión intermedia

Se llevó a cabo por tres analistas diferentes, empleando el mismo sistema cromatográfico. Para la determinación de la precisión intermedia, se evaluó la variación de los resultados de las determinaciones obtenidos a partir de tres réplicas de muestras preparadas al 100% de concentración. Cada analista construyó una curva de calibración para la cuantificación de sus muestras.

ESPECIFICIDAD

Al no disponer de estándares de impurezas y productos relacionados de los analitos que permitan demostrar que el método propuesto no se ve afectado por la presencia de los mismos, la especificidad se

evaluó mediante estudios de degradación forzada. Esto se llevó a cabo exponiendo muestras a condiciones de estrés para su posterior inyección en el sistema y evaluación de la pureza de los picos mediante la comparación de los valores del ángulo de pureza (PA) y umbral de ruido (TH); donde, si el valor de PA es mayor al de TH se presume que hay coelución de alguna impureza con el analito.

DEGRADACIÓN FORZADA

Para cada condición, se pesó 0,25 g de la muestra en balones aforados de 25,0 mL (excepto en el caso de termólisis, en el que se empleó un balón tipo Jenna de 50,0 mL capaz de soportar los cambios de temperatura) y posteriormente se sometieron a condiciones de estrés como se indica a continuación:

Fotólisis: la muestra fue expuesta a un sistema con exposición directa a luz UV proveniente de una lámpara durante 4 días continuos.

Hidrólisis ácida: se añadió 1,00 mL de ácido clorhídrico 0,1 N a la muestra y se dejó en reposo por 4 días.

Hidrólisis básica: se añadió a la muestra 1,00 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y se dejó en reposo por 4 días.

Oxidación: se añadió 1,00 mL de peróxido de hidrógeno al 3% a la muestra y se dejó en reposo por 4 días.

Termólisis: se sometió la muestra a calentamiento en un baño de agua durante 3 horas a una temperatura controlada de 60 °C.

Una vez concluido el tiempo de exposición, se adicionó a cada muestra 15 mL de fase

móvil y se agitaron mecánicamente en vórtex por 30 segundos, luego en baño de ultrasonido por 10 minutos y nuevamente en vórtex por 30 segundos. Se llevaron a volumen con fase móvil, las muestras luego fueron centrifugadas y posteriormente para cada una se transfirió 5,00 mL del sobrenadante a un balón aforado de 10,0 mL y se llevó a volumen con más fase móvil. Adicionalmente, se construyó una curva de calibración para llevar a cabo la cuantificación de los analitos. Las muestras fueron inyectadas en el sistema tras ser filtradas y los cromatogramas y gráficos de pureza resultantes gracias al PDA fueron evaluados para cada una de las pruebas.

EXACTITUD

La determinación de la exactitud se realizó según el método de agregado de estándar, el cual consiste en añadir a las muestras una cantidad conocida de estándar para obtener tres niveles de concentración correspondiente a 80%, 100% y 120% de la curva de calibración. Para cada nivel se realizaron tres réplicas, para un total de nueve determinaciones. El porcentaje de recuperación fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{([\text{conc. muestra enriquecida con patrón}] - [\text{conc. muestra sin enriquecer}])}{(\text{Valor aceptado como verdadero del patrón})} \times 100\%$$

En paralelo se construyó una curva de calibración para llevar a cabo la cuantificación.

Resultados

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se determinaron las figuras de mérito con la fase móvil final y el valor de platos

teóricos (N) fue de 1156 y 1764, el factor de asimetría (As) fue de 0,75 y 1,33, el factor de capacidad (K') de 1,028 y 1,57 para el clorhidrato de lidocaína y cloruro de decualinio, respectivamente en todos los casos. En cuanto a la resolución, esta fue de 2. Al realizar la prueba con la columna final C18 Waters® μ Bondapak (10 μ m x 3,9 mm x 300 mm) la resolución de los picos fue mejorada a un valor de 4,75.

En cuanto a los tiempos de retención en la fase estacionaria de la columna, estos fueron de 3,61 y 6,21 minutos para la lidocaína y el decualinio, respectivamente.

LINEALIDAD

Al calcular los coeficientes de correlación y determinación para ambos analitos a partir de las tres curvas de calibración construidas, se observó que existe linealidad entre los resultados obtenidos por el equipo y las concentraciones de las soluciones patrón, ya que se obtuvieron, para ambos coeficientes, valores $\geq 0,999$, tal como se observa en las Figuras 2-7.

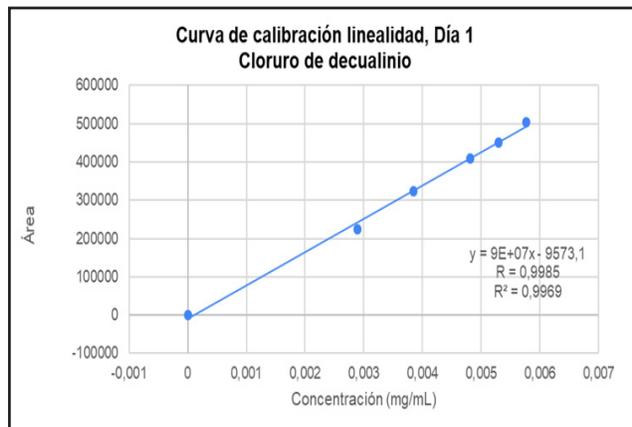


Figura 2. Curva de calibración linealidad día 1, cloruro de decualinio

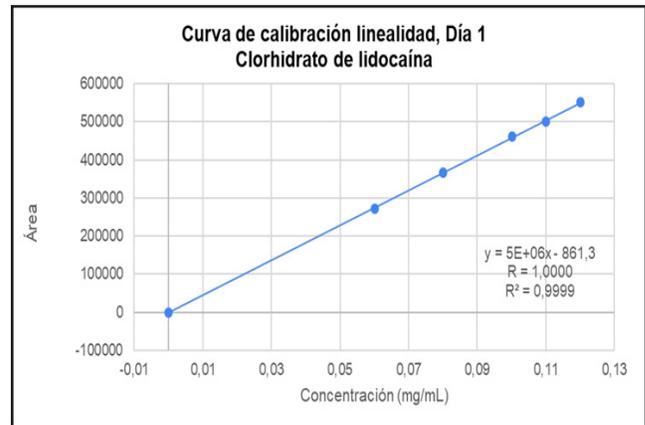


Figura 3. Curva de calibración linealidad día 1, clorhidrato de lidocaína

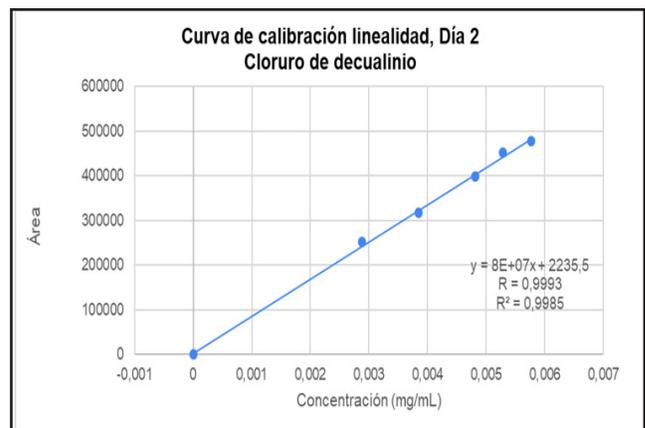


Figura 4. Curva de calibración linealidad día 2, cloruro de decualinio

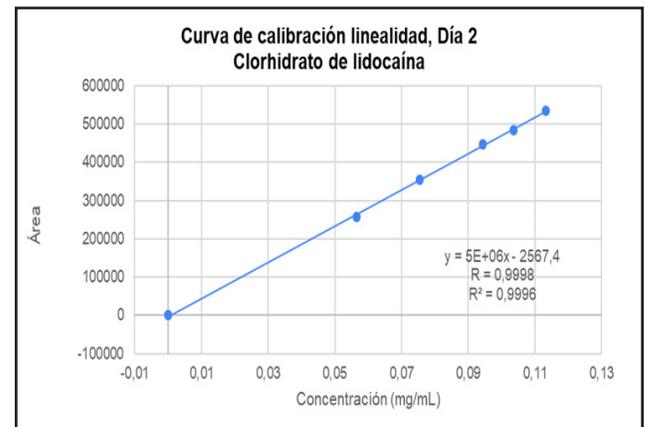


Figura 5. Curva de calibración linealidad día 2, clorhidrato de lidocaína

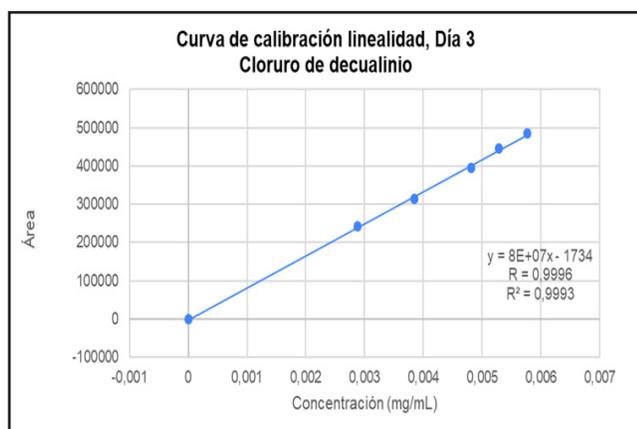


Figura 6. Curva de calibración linealidad día 3, cloruro de decualinio

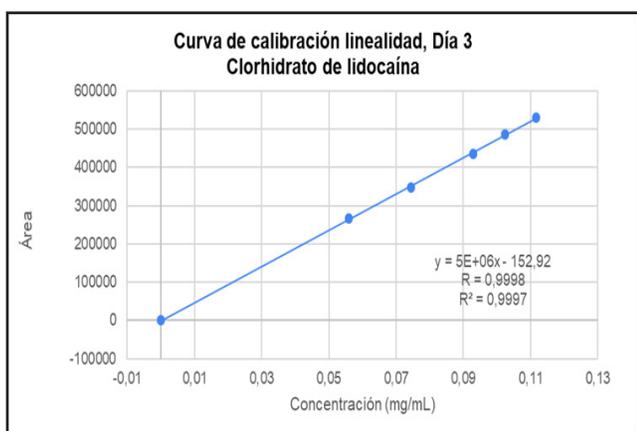


Figura 7. Curva de calibración linealidad día 3, clorhidrato de lidocaína

PRECISIÓN

Precisión del sistema

Tal como se observa en la Tabla I, se obtuvieron tiempos de retención promedio de 6,66 minutos para el cloruro de decualinio y 3,70 minutos para el clorhidrato de lidocaína, con un coeficiente de variación de 1,29% y 1,92%, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos son inferiores al 2%.

Repetibilidad

Se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 2%, tal como se resume en las Tablas II y III, correspondientes a ambos analitos.

Tabla I.

Precisión del sistema cromatográfico clorhidrato de lidocaína

Inyección	Cloruro de decualinio		Clorhidrato de lidocaína	
	t _r (min)	Área	t _r (min)	Área
1	6,53	408151	3,67	460344
2	6,63	418522	3,72	478223
3	6,66	420015	3,69	455936
4	6,79	416992	3,75	454121
5	6,70	412447	3,71	458068
6	6,64	410246	3,69	457521
Promedio	6,66	414396	3,70	460702
DE	0,09	4803	0,03	8834
CV	1,29	1,16	0,82	1,92

Precisión intermedia

Debido a que las pruebas fueron realizadas por distintos analistas, se evaluaron los coeficientes de variación según lo que establece la AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). Ésta indica que se consideran aceptables valores de coeficiente de variación inferiores al doble del coeficiente de variación del ensayo de repetibilidad. Así, en el caso del cloruro de decualinio, el valor máximo aceptado es de 3,99 y para el clorhidrato de lidocaína es de 2,86. Se observa en las Tablas IV y V que ambos coeficientes de variación cumplen con los parámetros mencionados.

Especificidad

Al evaluar los cromatogramas en las Figuras 8 y 9, se observa que los picos de ambos analitos de la muestra control se corresponden con los picos de los patrones. Al evaluar los cromatogramas de hidrólisis ácida, oxidación y termólisis (Figuras 11, 13 y 14, respectivamente) se encuentra que

Tabla II.
Repetibilidad para el cloruro de decualinio

Cloruro de decualinio				
Réplicas	Masa de muestra (g ± 0,001)	Área	Concentración (mg/tab)	% Respecto a lo declarado
1	1,065	474771	0,250	100,00
2	1,055	464824	0,250	100,00
3	1,057	469526	0,250	100,00
4	1,067	465138	0,240	96,05
5	1,061	475854	0,248	99,20
6	1,052	453597	0,240	96,03
		Promedio	0,246	98,55
		DE	0,005	1,97
		CV	1,994	1,99

Tabla III.
Repetibilidad para el clorhidrato de lidocaína

Clorhidrato de lidocaína				
Réplicas	Masa de muestra (g ± 0,001)	Área	Concentración (mg/tab)	% Respecto a lo declarado
1	1,065	474771	5,05	101,00
2	1,055	464824	4,99	99,80
3	1,057	469526	5,03	100,60
4	1,067	465138	4,94	98,80
5	1,061	475854	5,08	101,60
6	1,052	453597	4,89	97,80
		Promedio	5,00	99,93
		DE	0,07	1,43
		CV	1,43	1,43

existe pureza espectral, pues el ángulo de pureza (PA) es inferior al umbral de ruido (TH) en todos los casos. Por otro lado, se observa que la hidrólisis básica afecta al cloruro de decualinio, ya que al evaluar el cromatograma (Figura 12), no se observa el pico del mismo. Para el caso de la prueba de fotólisis, se pierde la pureza espectral del cloruro de decualinio al obtener un valor de TH inferior al PA, tal como se muestra en

la Figura 10. Al evaluar las Tablas VI y VII, se concluye que para varias de las pruebas de degradación forzada existen sustancias coeluyendo con los analitos de interés.

Exactitud

Los porcentajes de recuperación fueron evaluados en función de los parámetros establecidos por la AEFI, donde indica que los valores aceptados se encuentran

Tabla IV.
Precisión intermedia. Cloruro de decualinio

Cloruro de decualinio				
Analista	Réplica	Áreas	Decualinio (mg/tab)	CV individual
Analista 1	1	426497	0,246	1,22
	2	422754	0,246	
	3	417050	0,243	
Analista 2	1	413709	0,249	0,79
	2	423284	0,254	
	3	416572	0,250	
Analista 3	1	409715	0,260	1,16
	2	418907	0,250	
	3	419778	0,260	
Promedio			0,251	
DE			0,006	
CV promedio			2,421	

Tabla V.
Precisión intermedia. Clorhidrato de lidocaína

Cloruro de decualinio				
Analista	Réplica	Áreas	Decualinio (mg/tab)	CV individual
Analista 1	1	426497	0,246	1,22
	2	422754	0,246	
	3	417050	0,243	
Analista 2	1	413709	0,249	0,79
	2	423284	0,254	
	3	416572	0,250	
Analista 3	1	409715	0,260	1,16
	2	418907	0,250	
	3	419778	0,260	
Promedio			0,251	
DE			0,006	
CV promedio			2,421	

en el rango de 97,00-103,00% para cada nivel. Los resultados de los cálculos de porcentaje de recuperación se muestran en las Tablas VIII y IX.

Discusión

Para la determinación simultánea de cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína, se seleccionó la columna C18

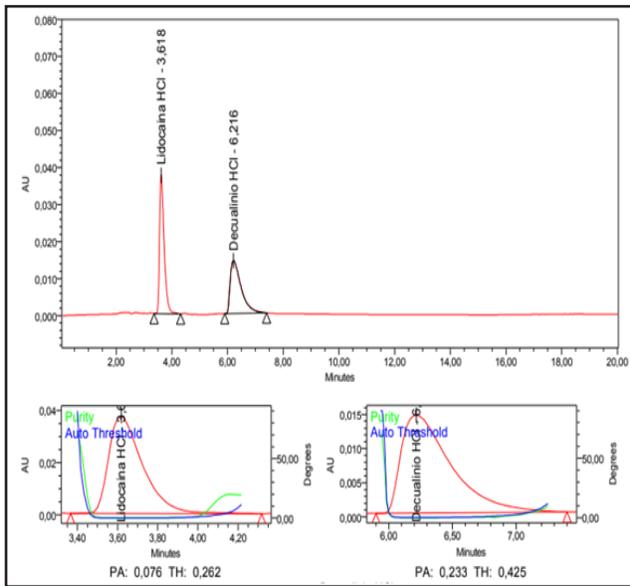


Figura 8. Cromatograma y gráficos de pureza de patrón control

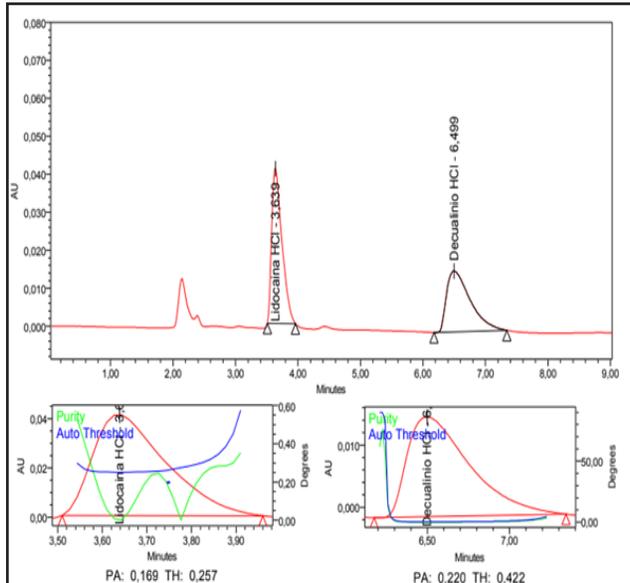


Figura 9. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra control

Waters® μ Bondapak (10 μ m x 3,9 mm x 300 mm) ya que presenta un número de platos teóricos aceptable, buena resolución de las señales cromatográficas y por ende una separación más eficiente de los analitos. La longitud de onda de trabajo seleccionada para la detección fue de 240 nm, ya que a esta longitud de onda se favorece la señal del cloruro de decualinio sin afectar la señal de la lidocaína. Adicionalmente,

la longitud de onda seleccionada se encuentra lejos de la longitud de onda de corte del metanol (sustancia presente en la fase móvil), garantizando de esta manera que la longitud de onda de corte del metanol no interferirá en la cuantificación de los analitos estudiados. La fase móvil seleccionada cuenta con un formador de par iónico que permitió mejorar la fuerza de retención de los analitos sobre la fase estacionaria.

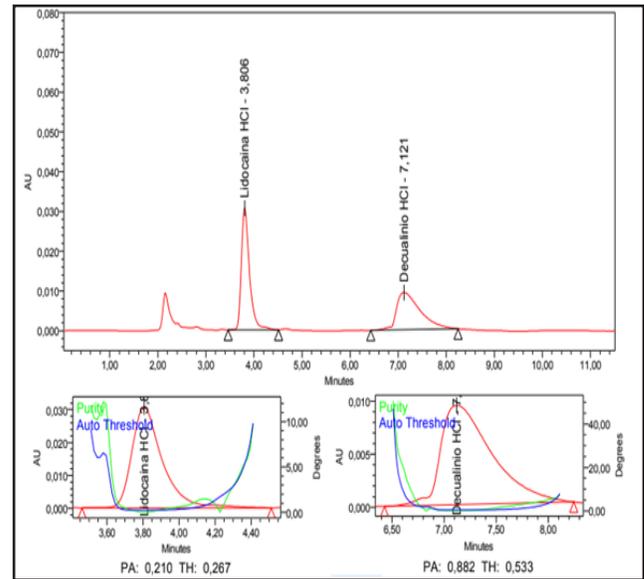


Figura 10. Cromatograma y gráficos de pureza de fotólisis

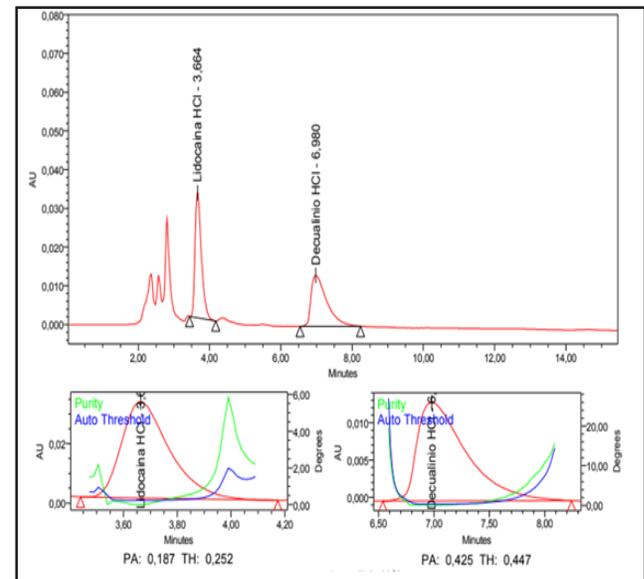


Figura 11. Cromatograma y gráficos de pureza de hidrólisis ácida

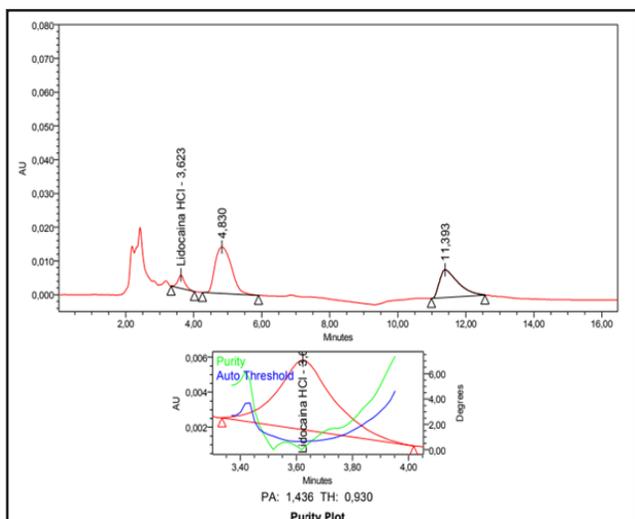


Figura 12. Cromatograma y gráficos de pureza de hidrólisis básica

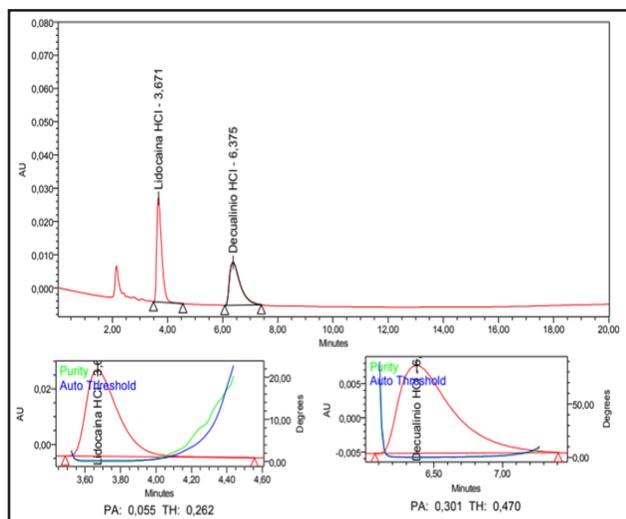


Figura 14. Cromatograma y gráficos de pureza de termólisis

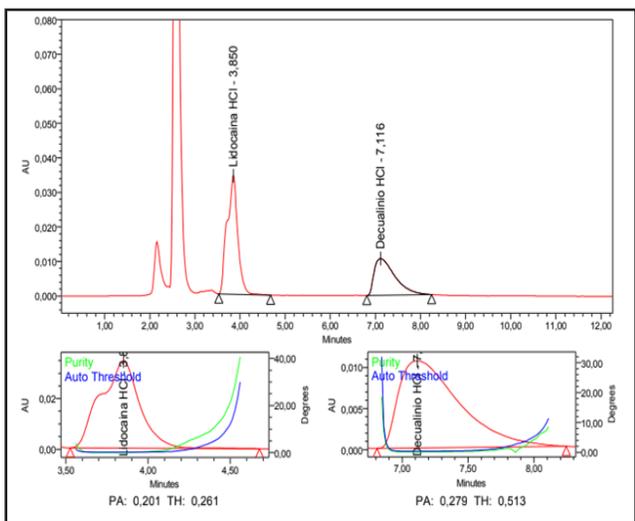


Figura 13. Cromatograma y gráficos de pureza de oxidación

Al evaluar la especificidad del método se encontró que, al someter a la muestra a distintas condiciones de degradación forzada, no se afecta la cuantificación simultánea de los analitos de interés. Sin embargo, se encontró que condiciones como la fotólisis y la hidrólisis básica, pueden afectar la estabilidad de las moléculas de los principios activos estudiados.

Al evaluar la linealidad se observó que las curvas de calibración resultantes demuestran que existe proporcionalidad entre las variables, con un rango de concentración de 0,0030 a 0,0060 mg/mL

Tabla VI.

Especificidad del método para clorhidrato de lidocaína

Condición	PA	TH	Área	Concentración (mg/tab)	% respecto al declarado	% degradación
Muestra control	0,169	0,257	467053	5,18	103,81	-
Muestra control en reposo	0,169	0,257	471368	5,02	108,66	-4,40
Fotólisis	0,210	0,267	359366	4,24	87,79	15,54
Hidrólisis ácida	0,187	0,252	401140	4,89	104,71	-0,74
Hidrólisis básica	1,436	0,930	55529	0,67	14,20	86,32
Oxidación	0,201	0,261	566241	6,68	138,30	-33,06
Termólisis	0,055	0,262	388314	4,53	92,73	10,77

PA = Ángulo de pureza; TH = Umbral de ruido

Tabla VII.
Especificidad del método para cloruro de decualinio

Condición	PA	TH	Área	Concentración (mg/tab)	% respecto a lo declarado	% degradación
Muestra control	0,220	0,422	421737	0,25	100,32	-
Muestra control en reposo	0,262	0,436	438796	0,25	108,13	-7,80
Fotólisis	0,882	0,533	320921	0,20	82,78	17,44
Hidrólisis ácida	0,425	0,447	405571	0,27	115,58	-15,40
Hidrólisis básica	-	-	-	-	-	-
Oxidación	0,279	0,513	339192	0,22	91,05	9,18
Termólisis	0,301	0,470	349252	0,22	90,05	10,22

PA = Ángulo de pureza; TH = Umbral de ruido

Tabla VIII.
Especificidad del método para cloruro de decualinio

Porcentaje de recuperación de cloruro de decualinio				
Nivel	% Recuperación	Promedio	CV	%Encontrado
80,00	99,38	99,36	0,03	79,49
	99,34			
100,00	98,63	99,93	1,26	99,93
	100,01			
120,00	101,15	98,76	0,49	118,52
	99,17			
	98,22			

Tabla IX.
Porcentaje de recuperación. Clorhidrato de lidocaína

Porcentaje de recuperación de clorhidrato de lidocaína				
Nivel	% Recuperación	Promedio	CV	%Encontrado
80,00	101,23	101,20	0,05	80,96
	101,17			
100,00	99,77	99,51	1,26	99,51
	100,61			
	98,15			
120,00	101,60	101,80	0,43	122,16
	102,30			
	101,51			

para el cloruro de decualinio y 0,06 a 0,12 mg/mL para el clorhidrato de lidocaína, con valores de coeficiente de correlación mayor de 0,999 para las curvas de calibración realizadas en tres días distintos.

Con relación a la precisión del método, se encontró que el sistema cromatográfico resultó ser preciso debido a que los valores de los CV obtenidos son inferiores al 2%, límite establecido por la USP. La precisión evaluada a través de la repetibilidad y la precisión intermedia del método se encuentra dentro de los límites establecidos, con valores de CV inferiores al 2% y cumpliendo con el parámetro establecido por la AEFI.

El método resultó ser exacto ya que los porcentajes de recuperación de ambos analitos cumplen con lo establecido por la AEFI.

Conclusiones

Se optimizó un método analítico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC) que permite la determinación simultánea de

cloruro de decualinio y clorhidrato de lidocaína en tabletas masticables. Las condiciones óptimas para el análisis son: Columna Waters® μ Bondapak C18 (10 μ m x 3,9 mm x 300 mm) a temperatura ambiente, fase móvil compuesta por 2 g de hexanosulfonato de sodio en 300 mL de agua grado HPLC con ajuste de pH a 4,0 con ácido acético y 700 mL de metanol a un flujo de 1,2 mL/min; volumen de inyección de 20 μ L y detección UV a 240 nm.

Asimismo, el método analítico fue validado según lo establecido en el Apartado <1225> de la USP 42, resultando ser:

Lineal ($R \geq 0,999$) para concentraciones dentro del rango de 0,0030 a 0,0060 mg/mL para el cloruro de decualinio y 0,06 a 0,12 mg/mL para el clorhidrato de lidocaína.

Preciso, ya que al evaluar la repetibilidad y precisión intermedia se encontraron valores de CV inferiores al 2% para ambos analitos.

Exacto, pues los porcentajes de recuperación obtenidos para ambos analitos se encuentran dentro del rango permitido por la AEFI (97,00% - 103,00%).

Específico para el cloruro de decualinio y el clorhidrato de lidocaína, ya que permite cuantificarlos sin verse afectado por la presencia de productos de degradación.

Recomendaciones

Realizar estudios de reproducibilidad, robustez, límite de detección y límite de cuantificación al método propuesto, con la finalidad de conocer mejor las posibles limitantes de su uso y tener una validación completa. Asimismo, se recomienda aplicar

esta metodología a un medicamento elaborado por otro laboratorio y corroborar si el método propuesto puede aplicarse a otras presentaciones.

Agradecimientos

Al laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por permitir el uso de sus espacios y hacer posible llevar a cabo esta investigación; y a los profesores María Antonieta Ranaudo y Francisco García de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por sus aportes que permitieron la discusión y justificación de algunos de los resultados.

Referencias Bibliográficas

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. 2001.
- Bailly C. 2021. Medicinal applications and molecular targets of dequalinium chloride. *Biochemical Pharmacology* 186:114467.
- Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 42. <1225> Validación de Procedimientos Farmacopéicos. Comité de Revisión de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. 2019.
- Farmacopea Europea (EP) 10.0. Cloruro de decualinio. Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos. 2019.
- Ochoa-Anaya G, Aguirre-Ibarra CP, Franco-Cabrera M. 2017. Lidocaína: aspectos generales y nuevas implicaciones en la inflamación. *Revista Mexicana de Anestesiología* 40(3): 220-225.



Estudio comparativo de dos excipientes para la elaboración de comprimidos bucodispersables

Comparative study of two excipients for the preparation of orodispersible tablets

LUNA Y DÍAZ BARBOSA¹, JULIO R LÓPEZ MARTÍNEZ², JENNIFER A PRADA MÁRQUEZ^{*3}

Resumen

Los comprimidos de desintegración oral (ODT), también conocidos como comprimidos bucodispersables, son formas de dosificación únicas formuladas para mejorar sus tasas de desintegración y disolución *in vivo*. Es un gran desafío para los productores de ODT lograr un tiempo de desintegración mínimo mientras mantienen una formulación simple y robusta. El objetivo del presente estudio fue evaluar 3 lotes de comprimidos bucodispersables con dos diluyentes, lactosa monohidratada y Manitol, a concentración mínima, intermedia y máxima del diluyente y de la croscarmelosa sódica. Los comprimidos se prepararon mediante el método de granulación húmeda y se evaluaron los parámetros de uniformidad de peso, dureza, espesor, tiempo de humectación y tiempo de desintegración. Los resultados indicaron que el lote 3 de manitol y el lote 3 de lactosa, elaborados con las concentraciones intermedias, fueron los lotes con mejor comportamiento al elaborar comprimidos bucodispersables, ya que se humectan en un tiempo inferior a 1 minuto y se desintegran en un tiempo menor a 3 minutos. Esto garantiza que el comprimido bucodispersable ejercerá una acción más rápida en los pacientes que requieren un alivio rápido de la sintomatología y que tienen problemas para deglutir como lo son la población geriátrica y pediátrica.

Palabras clave: Bucodispersables, Desintegración, Manitol, Lactosa, Excipientes, Comprimidos

Abstract

Orally disintegrating tablets (ODTs), also known as orodispersible tablets, are unique dosage forms formulated to improve their *in vivo* disintegration and dissolution rates. It is a big challenge for ODT producers to achieve a minimum disintegration time while keeping formulation simple and robust. This study aimed to assess 3 batches of orodispersible tablets with two diluents, lactose monohydrate, and Mannitol, at a minimum, intermediate, and maximum concentration of the diluent and croscarmellose sodium. The tablets were prepared by the wet granulation method and the parameters of weight uniformity, hardness, thickness, wetting time, and disintegration time were evaluated. Furthermore, it was determined whether the taste was pleasant in the mouth. The results indicated that batch 3 of mannitol and batch 3 of lactose, made with intermediate concentrations, were the batches with the best performance when making orodispersible tablets since they moisten in less than 1 minute and disintegrate in less than 3 minutes. This guarantees that the orodispersible tablet exerts a faster action for those patients who require rapid relief of symptoms and who have swallowing problems, such as the geriatric and pediatric population.

Keywords: Orodispersible, Disintegration, Mannitol, Lactose, Excipient, Tablet

Laboratorio de Procesos Industriales. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

*Correspondencia: jenniprada@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0003-3116-9506](https://orcid.org/0000-0003-3116-9506)

² [0000-0002-7469-1815](https://orcid.org/0000-0002-7469-1815)

³ [0000-0001-6298-8833](https://orcid.org/0000-0001-6298-8833)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.9](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.9)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 16/06/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 83-92. 2023

Introducción

Durante la última década, ha habido una mayor demanda de formas farmacéuticas más aptas y compatibles para el paciente. Como resultado de ello, la demanda por el desarrollo de nuevas tecnologías ha ido aumentando en el transcurso de los años. Dado que el costo de desarrollo de una nueva molécula de fármaco es muy alto, las empresas farmacéuticas se están esforzando por centrarse en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para fármacos ya existentes mejorando la calidad, seguridad y eficacia, junto con una frecuencia de dosificación reducida y una producción más rentable.

Una de las formas farmacéuticas más utilizadas en la actualidad son los comprimidos convencionales. Sin embargo, el inconveniente más evidente de las formas de dosificación oral comúnmente utilizadas, como tabletas y cápsulas convencionales, es la dificultad para deglutirlas, la presencia de náuseas, el bajo consumo de líquidos, las dietas, y la dificultad para tragar estas formas farmacéuticas. Los que están de viaje o tienen poco acceso al agua se ven igualmente afectados. Esto lleva a la incapacidad e incomodidad de los pacientes, incluso al grado de rechazarlas, lo que genera problemas de adherencia al tratamiento, particularmente en aquellos de carácter pediátrico, pero sucede lo mismo en pacientes de tipo geriátrico, en pacientes psiquiátricos o personas enfermas en cama que por su condición fisiológica no pueden deglutir fácilmente. También ocurre lo mismo con pacientes que han sido intervenidos quirúrgicamente o padecen disfagia, la cual se asocia a una serie de afecciones médicas como lo son accidentes cerebrovasculares y traumatismos craneoencefálicos (Rahane y

Rachh, 2018).

Debido a los problemas que presentan los comprimidos para esta clase de pacientes, se diseñaron las tabletas de desintegración oral que se desintegran rápidamente en contacto con la lengua, en un esfuerzo por facilitar la toma de comprimidos eficazmente, y por el deseo de que los pacientes no abandonen su tratamiento.

En efecto, por ello la industria farmacéutica que está en constante innovación, ha desarrollado los llamados comprimidos bucodispersables, los cuales, al dispersarse en la cavidad oral, son aptos para este tipo de pacientes, además aumentan la biodisponibilidad de los fármacos y siguen presentando las mismas ventajas de los comprimidos convencionales (Bi y col., 1996; Bhyan y col., 2011).

Cabe destacar que la vía oral sigue siendo la forma preferida de administración, debido a una gran variedad de ventajas y al alto cumplimiento por parte del paciente en comparación con otras vías de administración.

Las tabletas de desintegración oral (ODT, *Oral Desintegration Tablet*) constituyen una forma de dosificación sólida que contienen sustancias medicinales o fármaco con rápida desintegración usualmente en unos segundos cuando son colocadas sobre la lengua. Se formulan de tal manera que se dispersan o desintegran rápidamente en la cavidad oral, en cuestión de segundos o máximo 3 minutos (*Guidance for Industry Orally Disintegrating Tablets*. 2008.U.S.). Debido a la rápida absorción de agua en el núcleo de los comprimidos, la rápida desintegración de las tabletas y la posterior disolución de los componentes solubles en agua conduce a la disolución rápida

de los comprimidos. El medicamento disgregado se traga o es sometido a absorción pregástrica, lo cual puede llevar a aumentar la velocidad o grado de absorción del fármaco y disminuir el metabolismo hepático. Esta forma de dosificación se desarrolló originalmente para mejorar el cumplimiento de los pacientes que tenían dificultad para tragar tabletas, como niños, ancianos y pacientes postrados en cama.

Los productos ODT se han desarrollado para numerosas indicaciones como artritis o migraña, para las que es importante un inicio de acción rápida, donde el paciente experimenta dolor (Mennini y col., 2018), así como crisis hipertensivas (Dennison y col., 2017), hasta enfermedades mentales, para las que el cumplimiento del paciente es importante para el tratamiento de indicaciones crónicas como la depresión y la esquizofrenia (Montgomery y col., 2012).

Los comprimidos bucodispersables se formulan mediante diferentes técnicas de manufactura (Fernandes y col., 2017). En el presente trabajo se empleó una formulación para cuya elaboración se utilizó la granulación húmeda, la cual se debe realizar la correcta elección de los excipientes y sus proporciones. Para lo cual, se procedió a la evaluación y la comparación de lotes en cuya formulación se utilizaron dos tipos de diluentes a distintas proporciones, y se eligió el que garantizó los mejores resultados de tiempo de desintegración, tiempo de humectación, porcentaje de ganancia de peso y dureza.

Por lo antes expuesto, el presente estudio tuvo como objetivo comparar dos excipientes para la elaboración de

comprimidos bucodispersables. Para ello; 1. Se realizaron estudios de preformulación para cada uno de los componentes; 2. Se establecieron los criterios de aceptación para las tabletas; y 3. Se compararon los resultados obtenidos por cada uno de los excipientes y se seleccionó uno de ellos.

Materiales y métodos

PREFORMULACIÓN

Se realizó una preformulación de los excipientes a comparar (Manitol y Lactosa Monohidratada), con la finalidad de evaluar las propiedades de flujo de estos y así determinar el método de compresión a utilizar. Para estos estudios de preformulación se determinó el índice de compactación y se realizó un análisis granulométrico tanto de la lactosa como del manitol.

ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

Para determinar la granulometría de las materias primas se empleó una batería de tamices N° 20, 40, 60, 80, 100, fondo receptáculo y una balanza analítica marca Ohaus.

ÍNDICE DE COMPACTACIÓN

Para determinar el índice de compresibilidad de las materias primas se empleó un cilindro graduado de capacidad de 25 mL y un tacómetro. Posteriormente, se realizó el análisis de dichas propiedades de flujo a partir de los resultados del análisis granulométrico y el índice de compactación, dando como resultado que las propiedades de flujo no eran adecuadas para realizar una compresión directa, por lo tanto, se realizó una granulación húmeda.

GRANULACIÓN HÚMEDA

El método de granulación húmeda utilizado en la elaboración de los comprimidos bucodispersables fue la aglutinación ligante, en donde se incorpora un agente aglutinante como la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), con la finalidad de impartir a la mezcla de polvos propiedades cohesivas, pero también mejorar las propiedades de flujo del granulado y su dureza.

FORMULACIONES

Se elaboraron 6 lotes de comprimidos bucodispersables placebo utilizando la concentración de uso mínima, media y máxima tanto de manitol como de lactosa. Además, se utilizó la croscarmelosa de sodio, el cual es un compuesto entrecruzado de carboximetilcelulosa sódica usado como desintegrante en formulaciones farmacéuticas. El entrecruzamiento reduce la solubilidad en agua al tiempo que permite que el material se hinche y que absorba muchas veces su peso en agua. Como resultado, proporciona al comprimido una disolución y desintegración superior, mejorando así la biodisponibilidad de los componentes activos facilitando su disolución en los fluidos digestivos y su posterior absorción. Para la formulación se usó la concentración mínima de croscarmelosa en los lotes que utilizaron concentración mínima de manitol, y de lactosa, concentración media de croscarmelosa en los lotes que utilizaron la concentración media de lactosa y manitol, y la concentración máxima de croscarmelosa en los lotes que utilizaron la concentración máxima de manitol y lactosa.

En la Tabla I se presentan las fórmulas cuali-cuantitativa de cada lote de fabricación según el excipiente utilizado.

MÉTODO DE ELABORACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS BUCODISPERSABLES

En primer lugar, se realizó un mezclado sólido-sólido por orden ascendente de peso de los excipientes intragranulos, los cuales fueron la sacarina, el sorbitol, el saborizante, la croscarmelosa intragranular y los respectivos diluyentes en estudio. Consiguientemente, se efectuó un mezclado sólido-líquido con una dispersión aglutinante de HPMC hasta alcanzar el punto óptimo de aglutinación que no es más que la obtención de una masa moldeable no pegajosa. Dicha masa húmeda se tamizó por una malla N° 12, de tal manera de aumentar el área de superficie para favorecer el secado a temperatura ambiente por 48 horas. Pasado el tiempo de secado se procedió a tamizar los gránulos secos por la misma malla N°12 y seguidamente se llevó a cabo el mezclado por 2 minutos con los excipientes extragranulos para finalmente comprimir y obtener tabletas dentro de un rango de peso de 125 mg \pm 10%.

EVALUACIÓN DE ODTs

1. Control de peso

El ensayo se lleva a cabo tomando nota del peso individualmente de 10 tabletas, se calcula el promedio y posteriormente se compara con el peso individual de cada tableta (Tabla II).

Criterio de aceptación:

1. No más de dos tabletas deben quedar fuera del límite establecido.
2. Ninguna tableta debe diferir en más del doble del límite permitido.

Tabla I.

Datos de cada lote tanto de manitol como de lactosa

Ingredientes	Concentración de uso Lote 1	Concentración de uso Lote 2	Concentración de uso lote 3
Croscarmelosa sódica	5%	0,5%	2,75%
HPMC	6%	6%	6%
Sacarina	0,02%	0,02%	0,02%
Estearil Fumarato	1%	1%	1%
Saborizante cereza	0,25%	0,25%	0,25%
Manitol o Lactosa Monohidratada	65%	10%	37,5%
Sorbitol	22,73%	82,23%	52,48%

Fuente: Propia de los autores

2. Friabilidad

Se pesan 20 tabletas de cada lote y se colocan en el fibrilador que girará a 25 rpm durante 4 min. Se quita el polvo de todas las tabletas y se pesa de nuevo. El porcentaje de friabilidad se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ friabilidad} = ((W1-W2)100) / W1$$

W1 = peso de tableta antes de la prueba

W2 = peso de tableta después de la prueba

Criterio de aceptación: <1%

3. Dureza

En el ensayo se emplea el aparato medidor de dureza colocando el comprimido entre los dos brazos del aparato y aumentando la presión hasta que se produzca la ruptura. Se realiza la medición sobre un máximo de 10 tabletas.

Criterio de aceptación: 3-5 kg/cm²

Tabla II.

Especificación USP para uniformidad de peso

S.No.	Average weight of Tablets(mg)	Maximum % difference allowed
1	130 or less	10
2	130-324	7.5
3	More than 324	5

4. Tiempo de desintegración

Se coloca 1 tableta en cada uno de los seis tubos de la canastilla y se agrega los discos a cada uno de los tubos. Se hace funcionar el aparato, usando 500 mL de agua destilada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, de modo que las tabletas permanezcan debajo de la superficie del líquido.

Criterio de aceptación: las tabletas se deben desintegrar en menos de 3 minutos.

5. Tiempo de Humectación y proporción de absorción de agua

Se coloca un trozo de papel de filtro doblado dos veces en una placa de Petri pequeña que debe contener 5 mL de agua y 0,01% p/v de cristal violeta. Seguidamente se pesa una tableta y se coloca sobre el papel. Se mide el tiempo necesario para humedecer por completo la tableta. La humectación completa se puede tomar como el momento en que el agua coloreada cubrió toda la tableta.

$$R = (W_a - W_b) / (W_b * 100)$$

W_b = peso de la tableta antes de la absorción de agua

W_a = peso de la tableta después de la absorción de agua

Criterio de aceptación: < 1 minuto.

6. Sabor/Sensación a la boca

La evaluación de sabor la realiza un panel de 5 miembros utilizando el método de intensidad de tiempo. Se coloca una tableta en la boca durante 10 seg y se registra el sabor al instante y luego, después de 10 seg, 1, 2, 4, y 6 min. La opinión de los voluntarios sobre el sabor se califica dando diferentes valores de puntuación.

Valores de puntuación:

0= bueno

1=insípido

2=ligeramente amargo

3= amargo

4= horrible

Resultados y Discusión

Los resultados variación de peso (mg) en tabletas placebo de manitol y lactosa se observan en la Figuras 1 y 2, respectivamente. El comportamiento de la dureza en tabletas placebo de manitol y lactosa se observan en la Figuras 3 y 4, respectivamente. El comportamiento del espesor en tabletas placebo de manitol y lactosa se observan en la Figuras 5 y 6, respectivamente. El comportamiento de la friabilidad en tabletas placebo de manitol y lactosa se observan en la Figuras 7 y 8, respectivamente. El comportamiento del tiempo de desintegración de tabletas placebo de manitol y lactosa se observan en la Figuras 9 y 10, respectivamente. Como se observa, los resultados se encuentran en los límites establecidos oficialmente.

Los resultados comparativos de los controles de todos los lotes se presentan en las Tablas III y IV.

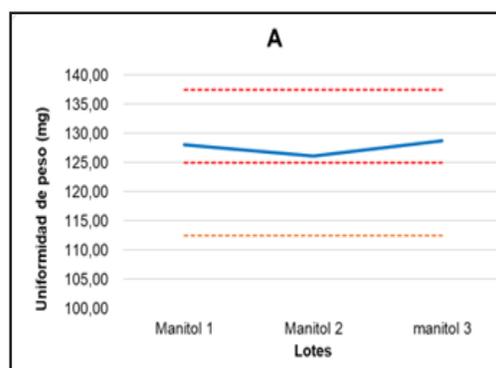


Figura 1. Comportamiento de la variación de peso (mg) en tabletas placebo de manitol

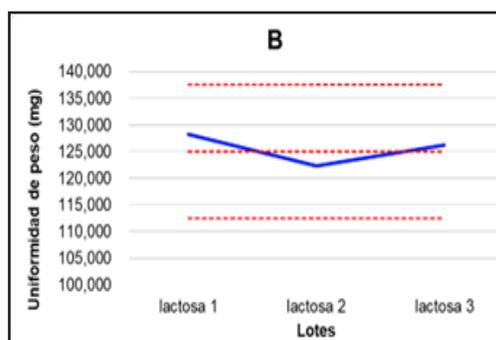


Figura 2. Comportamiento de la variación de peso (mg) en tabletas placebo de lactosa

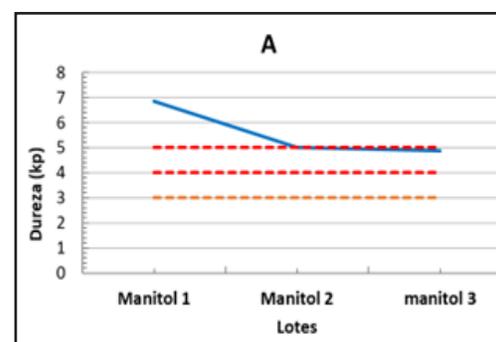


Figura 3. Comportamiento de la dureza de las tabletas de placebo de manitol

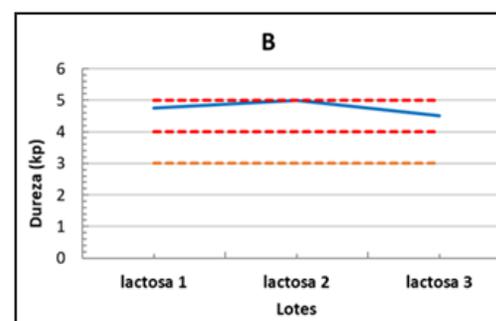


Figura 4. Comportamiento de la dureza de las tabletas de placebo de lactosa

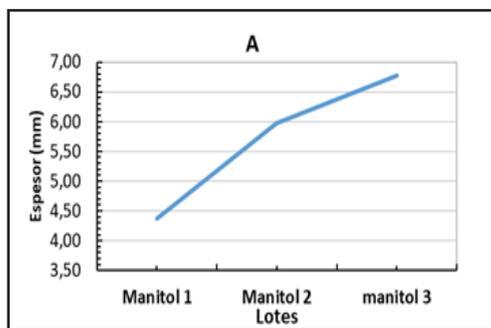


Figura 5. Comportamiento del espesor de las tabletas placebo de manitol

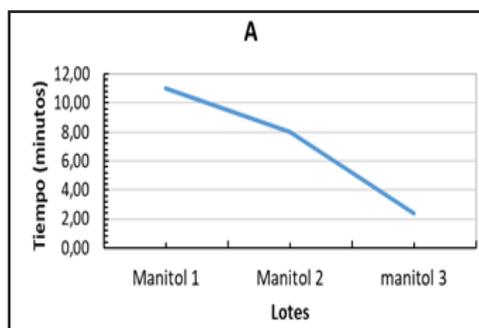


Figura 9. Comportamiento del tiempo desintegración de las tabletas placebo manitol.

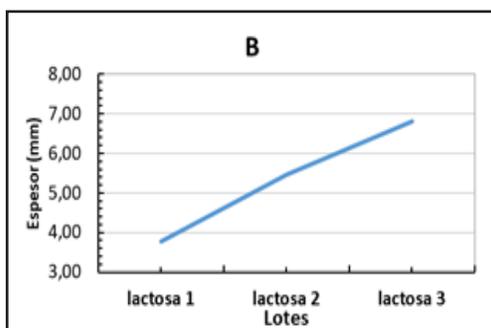


Figura 6. Comportamiento del espesor de las tabletas placebo de lactosa

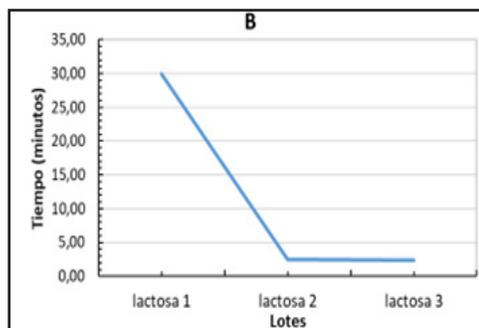


Figura 10. Comportamiento del tiempo desintegración de las tabletas placebo de lactosa

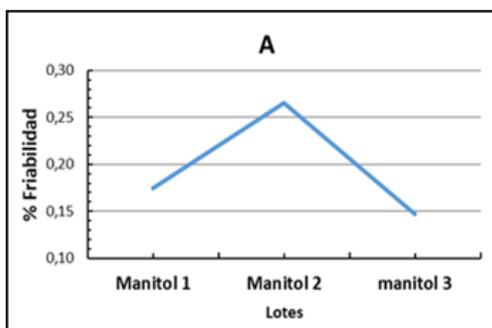


Figura 7. Comportamiento de la friabilidad las tabletas placebo de manitol

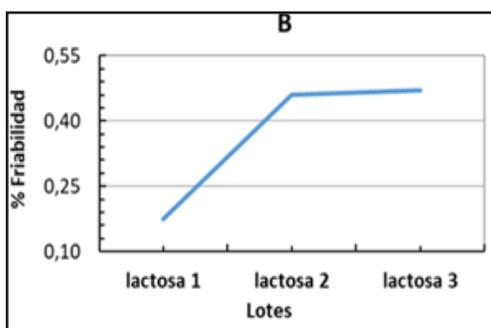


Figura 8. Comportamiento de la friabilidad de las tabletas placebos de lactosa

Se considera que los lotes que poseen las mejores características luego de la compresión entre los lotes de manitol fue el lote 3 y entre los lotes de lactosa monohidratada el lote 3, debido a que tuvieron un tiempo de desintegración menor a 3 minutos, un tiempo de humectación inferior a un minuto y un porcentaje de absorción de agua mayor. Entre estos 2 lotes, los tiempos de desintegración fueron similares, siendo el del lote de manitol ligeramente inferior al lote de lactosa, el tiempo de humectación del lote de lactosa fue más de 2 veces inferior al de manitol y además mayor porcentaje de absorción de agua.

Además, es importante resaltar que, en los lotes 1, tanto de lactosa monohidratada y manitol (que son los lotes que tuvieron mayor concentración de dichos diluentes), sus tiempos de desintegración fueron considerablemente mayores al resto,

Tabla III.
Controles de lotes

Lote	% Excipiente	% Croscarmelosa	% HPMC
Manitol 1	65%	5	7,1065
Manitol 2	10%	0,5	3,6102
Manitol 3	37,5 %	2,75	6,4398
Lactosa 1	65%	5	5,688
Lactosa 2	10%	0,5	4,0296
Lactosa 3	37,5 %	2,75	3,9737

Fuente: Propia de los autores

debido a que todo el superdesintegrante quedó intragránulo; sin embargo, es necesario acotar que el lote de manitol, tuvo un tiempo de desintegración casi 3 veces inferior al lote de lactosa monohidratada, a pesar de tener mayor dureza y mayor concentración de HPMC.

Por otra parte, en los lotes 2, tanto de manitol como de lactosa monohidratada (los cuales utilizan las menores concentraciones de dichos excipientes) se puede observar que el tiempo de desintegración del lote que utilizó lactosa monohidratada, tuvo un tiempo que no solamente cumple con el parámetro, sino que también fue casi 3 veces inferior al lote que utilizó manitol.

En relación con la humectación, es evidente que los lotes de lactosa tuvieron,

no solo mejores tiempos de humectación, sino mayor porcentaje de ganancia de peso al absorber agua, por lo que se puede evidenciar que la lactosa monohidratada, tiene una mayor afinidad por el agua que el manitol.

Al evaluar los lotes de lactosa, se observa que cuando se utilizaron las concentraciones intermedia y menor, los tiempos de desintegración cumplieron con el parámetro, pero el lote que utilizó la mayor concentración de lactosa tuvo un tiempo de desintegración 10 veces mayor a los otros 2 lotes, y casi 3 veces mayor al lote que utilizó la mayor concentración de manitol. Esto puede deberse a que la lactosa monohidratada tiene propiedades aglutinantes, conferidas por el agua de cristalización que posee. Entonces, en concentraciones altas de lactosa monohidratada, predomina la propiedad aglutinante de la misma. Esta propiedad aglutinante de la lactosa monohidratada también fue la responsable de que los lotes de lactosa necesiten menos HPMC que los lotes de manitol.

Con respecto a los lotes de manitol, se puede evidenciar que el lote 3, que tiene mayor concentración de manitol que el lote 2, tuvo un mejor tiempo de desintegración

Tabla IV.
Controles de lotes

Lotes	Tiempo de desintegración (min)	% Agua absorbida	Tiempo de humectación (min)	Dureza (Kp)
Manitol 1	11:00	16	1:50	6,86
Manitol 2	8:00	14	1:09	5
Manitol 3	2:36	26	0:45	4,88
Lactosa 1	30:00	31,52	2:00	4,75
Lactosa 2	2:48	8,79	0:28	5
Lactosa 3	2:40	40,96	0:20	4,5

Fuente: Propia de los autores

que el lote 2. El lote 1, que fue el que tuvo mayor concentración de manitol, a pesar de tener toda la croscarmelosa intragránulo, la mayor dureza de todas, y además, la mayor concentración de HPMC, solo superó por 3 minutos de diferencia al tiempo de desintegración del lote 2 de manitol. Esto puede deberse a que el manitol, no tiene la propiedad aglutinante que tiene la lactosa monohidratada.

En relación con la prueba de sabor, al ser comprimidos bucodispersables elaborados con solo excipientes (tabletas placebos) su sabor era bueno-agradable, específicamente dulce, porque ambos excipientes eran derivados de azúcar. Sin embargo, se considera que este ensayo no es un requisito en esta formulación, ya que las tabletas placebo al no contener principios activos no requieren agentes que enmascaren el sabor desagradable que estos pudiesen generar.

Resultados similares son los reportados por Howida Kamal y El-Setouhy, 2010, quienes desarrollaron comprimidos bucodispersables de valsartán, a dosis de 40 mg, con la intención de facilitar la administración a pacientes con problemas para tragar y, mejorar su escasa biodisponibilidad oral, en el que se evaluaron diferentes excipientes, entre ellos manitol y lactosa en presencia del principio activo valsartán. Se estudiaron los efectos del tipo de relleno, el tipo de aglutinante y la concentración de aglutinante. Las diferentes fórmulas de las tabletas se caracterizaron por sus propiedades físicas, variación de peso, tiempo de desintegración, propiedades superficiales, propiedades humectantes y disolución *in vitro*. Entre las fórmulas de tabletas preparadas, se seleccionó la fórmula que consistía en 4:6 de valsartán:manitol y

2% de pectina, para la evaluación *in vivo*. En la presente investigación, el lote con mayor concentración de lactosa tuvo mayor tiempo de desintegración en comparación al lote con mayor concentración de manitol, tal como ocurrió en el los comprimidos bucodispersables de valsartán (Howida Kamal y El-Setouhy, 2010), donde las tabletas en las que se utilizó manitol como relleno, tuvieron menor tiempo de desintegración que las tabletas donde se utilizó la lactosa. Siendo la velocidad aparente de absorción de valsartán de los comprimidos significativamente mayor que la de los comprimidos convencionales, y la biodisponibilidad relativa calculada como la relación del área total media bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de los comprimidos bucodispersables en relación con los convencionales fue del 135 %. Lo que revela que los comprimidos bucodispersables de valsartán que son formulados de esa forma son ventajosos con respecto a la mejora del cumplimiento por parte del paciente, el inicio rápido de la acción y el aumento de la biodisponibilidad. Esto indica que en ambas formulaciones, la lactosa fue la que tardó más en desintegrarse, al usarse en mayor concentración, a pesar que unas son tabletas placebo y las otras usan principio activo.

Conclusiones

Se puede concluir que ambos excipientes son adecuados para la formulación de comprimidos bucodispersables que cumplen con los parámetros establecidos, pero en caso de utilizar lactosa, lo más recomendable es utilizar concentraciones bajas (entre 10% y 30%) ya que, a esa concentración, se garantiza una alta absorción de agua, buenos tiempos de

desintegración y de humectación y se aminora la condición aglutinante de la lactosa monohidratada.

Por otra parte, si se desean formular comprimidos bucodispersables utilizando manitol, se recomienda utilizar proporciones de intermedias a altas (entre 35% y 65%) ya que, a estas proporciones, se aseguran buenos tiempos de desintegración. Además, el manitol es una buena alternativa en caso de pacientes con intolerancia a la lactosa.

Recomendaciones

Se recomienda para futuros trabajos de investigación de bucodispersables realizar un diseño factorial (Tawfeek y col., 2014), para obtener concentraciones de uso de excipientes más exactas o precisas de manera que permita garantizar los mejores resultados, tal y como fue realizado en el estudio denominado comprimidos bucodispersables de valsartán (Howida Kamal y El-Setouhy, 2010).

Agradecimientos

Los autores agradecemos a los profesores de la mención Tecnología Industrial, muy especialmente a nuestra profesora Julibel Martínez y nuestro padrino David De Sousa de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela por el apoyo, ánimo y consejos que nos dieron para realizar esta investigación.

Referencias Bibliográficas

Bi Y, Sunada H, Yonezawa Y, Danjo K, Otsuka A. 1996. Preparation and evaluation of compressed

tablets rapidly disintegrating in the oral cavity. Chem Pharm Bull 44:2121-2127.

Bhyan B, Jangra S, Kaur M and Singh H. 2011. Orally fast dissolving films: Innovations in formulation and technology. Int J Pharm Sc Rev Res 9:50-75.

Dennison TJ, Smith JC, Badhan RK, Mohammed AR, 2017. Fixed-dose combination orally disintegrating tablets to treat cardiovascular disease: formulation, *in vitro* characterization and physiologically based pharmacokinetic modeling to assess bioavailability. Drug Design Development Therapy 11: 811-826.

Fernandes Tavares DF, Espada García JI, Martín Sabroso C, Gil Alegre ME, Torres Suárez AI. 2009. Comprimidos bucodispersables: ventajas terapéuticas y tecnológicas de elaboración. ARS Pharmaceutica 50(3) 153-167.

Guidance for Industry Orally Disintegrating Tablets. 2008.U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pág. 2. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

Howida Kamal I, El-Setouhy D. 2010. Valsartan Orodispersible Tablets: Formulation, *In vitro/ In vivo* Characterization. AAPS PharmSciTech 11:189-196.

Mennini N, Orlandini S, Furlanetto S, Pasquini B, Mura P. 2018. Development and Optimization by Quality by Design Strategies of Frovatriptan Orally Disintegrating Tablets for Migraine Management. Curr Drug Deliv 15(3):436-445.

Molina C, Torrado S. 2017. Comprimidos Bucodispersables. Tesis de grado. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid, España.

Montgomery W, Treuer T, Karagianis J, Ascher-Svanum H, Harrison G. 2012. Orally disintegrating olanzapine review: effectiveness, patient preference, adherence, and other properties. Patient Prefer Adherence 6: 109-125.

Rahane R, Rachh PR. 2018. A Review on Fast Dissolving Tablet. J Drug Delivery & Therapeutics 8(5):50-5.

Tawfeek H, Elsayed M, Elnashar J. 2014. Development and optimization of itopride hydrochloride fast disintegrating tablets using factorial design and response surface methodology. International J Pharmaceutical Sci Res 6(4):1661-1672.



Papel del receptor de la Lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de la aterosclerosis

Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 as a serum marker of atherosclerosis

LETICIA FIGUEIRA^{*1 a,b}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{2 a,c}

Resumen

El receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina -1 (LOX-1) es una glicoproteína transmembrana que constituye el principal receptor de las lipoproteínas de baja densidad oxidada (LDLox), que participa en la disfunción endotelial, apoptosis y formación de células espumosas, eventos claves en la fisiopatología de la aterosclerosis. En el presente estudio se evaluó los niveles séricos de LOX-1, LDLox y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol. Para ello, 42 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en dos grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, LOX-1, LDLox y TBARS al inicio, 4ta, 8va y 12ma semana de experimentación. 7 conejos de cada grupo fueron sacrificados a la 4ta, 8va y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento en los niveles séricos de LOX-1, LDLox y TBARS en el grupo 2 desde la 4ta semana de experimentación con respecto al control (Grupo 1) ($p < 0,0050$), lo cual se vio acompañado de ateromas. En conclusión, el LOX-1, LDLox y TBARS son marcadores séricos no invasivos de aterosclerosis; corroborando el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la aterosclerosis.

Palabras clave: Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina -1, lipoproteína de baja densidad oxidado, estrés oxidativo, aterosclerosis

Abstract

Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) is a transmembrane glycoprotein that constitutes the main receptor for oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) and is involved in atherosclerosis and contributes to endothelial dysfunction, apoptosis, and foam cell formation. We evaluated the serum levels of LOX-1, oxLDL, and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 42 New Zealand white male rabbits were randomly divided into two groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on basal, fourth, eighth, and twelfth weeks, and concentration of lipid profile, LOX-1, oxLDL, and TBARS was determined. Seven of the animals from each group were sacrificed on the fourth, eighth, and twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the LOX-1, oxLDL, and TBARS levels were significantly higher in Group 2 than in Group 1 starting on 4th week ($p < 0.0050$), which was accompanied by atherosclerotic lesions. These results support that serum LOX-1, oxLDL, and TBARS levels are noninvasive markers of atherosclerosis, supporting the role of oxidative stress in the physiopathology of atherosclerosis.

Keywords: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, oxidized low-density lipoproteins, oxidative stress, atherosclerosis

^aLaboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo – Venezuela. ^bLaboratorio Clínico Dra. Leticia Figueira Carabobo – Venezuela, ^cLaboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela. *Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0003-5865-5355](https://orcid.org/0000-0003-5865-5355)

² [0000-0003-1980-5848](https://orcid.org/0000-0003-1980-5848)

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno-inflamatoria crónica de los vasos sanguíneos que tiene como evento final la formación de la placa de ateroma. La infiltración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial y su posterior oxidación constituye el evento inicial en el proceso de formación de la placa de ateroma, la cual es seguida por la infiltración, activación de células inflamatorias y la formación de las células espumosas (Khosravi y col., 2019).

La oxidación de las LDL, es un evento crucial para la aterogénesis; pues las LDL oxidadas (LDLox) poseen propiedades aterogénicas bien establecidas, ya que inducen la expresión de moléculas de adhesión celular, estimulan la activación de linfocitos, promueven la liberación de citoquinas inflamatorias, estimulan a las células musculares lisas, alteran la producción de óxido nítrico (NO), promueven la agregación plaquetaria y la formación de trombos y son quimiotácticas para los monocitos y macrófagos (Zingg y col., 2021).

Durante los últimos años, se ha reconocido que la inflamación juega un papel muy importante en la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis (Marchio y col., 2019; Zingg y col., 2021); de hecho, se ha descrito que las LDLox estimulan la deposición de lípidos y la respuesta inflamatoria en la pared de los vasos sanguíneos, además de activar al receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 (LOX-1) (Kattoor y col., 2019).

El LOX-1 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la clase E de receptores carroñeros (SR) que media

la captación e internalización de las LDLox (Ogura y col., 2009; Xu y col., 2013; Tone y col., 2019). Este receptor constituye el principal receptor de las LDLox en las células endoteliales y se expresa en los macrófagos y células del músculo liso (Takanabe-Mori y col., 2013); es inducido por el estrés oxidativo y se asocia con la formación y desestabilización de la placa aterosclerótica; de hecho, el LOX-1 interactúa con la proteína C reactiva (PCR) y desempeña un papel prominente en las enfermedades inflamatorias (Stancel y col., 2016; Kattoor y col., 2019).

Existe evidencia de la estrecha relación entre el LOX-1 y la aterosclerosis, pues es responsable de mediar la mayoría de los efectos tóxicos de la LDLox; de hecho, se ha descrito que el LOX-1 se encuentra expresado en las lesiones ateroscleróticas, lo cual sugiere que podría desempeñar un papel importante desde las primeras etapas de la aterosclerosis, ya que funciona como una molécula de adhesión celular y está implicada en la inflamación (Kuge y col., 2008; Gorga y col., 2013; Pirillo y col., 2013); de igual manera se ha sugerido que el LOX-1 induce disfunción endotelial y contribuye en la formación y progresión de la placa aterosclerótica (Kattoor y col., 2019; Tone y col., 2019).

A pesar de la creciente evidencia de que el LOX-1 está implicado en la aterogénesis; su participación en la desestabilización de la placa, ruptura y la formación de trombos *in vivo*, no está clara. Se ha descrito un aumento en la expresión de esta proteína en la placa vulnerable y en eventos apoptóticos (Kuge y col., 2008), por lo tanto, el LOX-1 está implicado en procesos moleculares aterogénicos, y su capacidad de unirse a diversos ligandos hace que este receptor sea un biomarcador probable de

enfermedad vascular, así como un posible blanco farmacológico en el manejo de las enfermedades cardiovasculares (Reiss y col., 2009). A pesar de que está bien documentado que el LOX-1 participa en la fisiopatología de la aterosclerosis, no está clara su evolución a lo largo del proceso aterogénico. Es por lo que, en el presente estudio se evaluó los niveles séricos de LOX-1 como un posible biomarcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 42 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene "Rafael Rangel" (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 21 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol.

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante

y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Publications No. 8023,1978).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela)

Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc), suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

La administración de colesterol mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmusen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil-éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en

las semanas 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) por método enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de LDLox y LOX-1 fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). Los TBARS fueron cuantificados mediante un método colorimétrico, el cual consistió en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979). Para ello, las muestras de suero fueron tratadas con ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4°C. Seguidamente, el sobrenadante fue incubado con ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 10 min a 100°C. Paralelamente se construyó una curva patrón con malonildialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y expresados como malonildialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados en μM .

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATEROSCLERÓTICAS

Se sacrificó por dislocación cervical 7 conejos de cada grupo a la 4^{ta}, 8^{va} semana y al final del estudio. Se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo con la clasificación de la American Heart Association, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary y col., 1995).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó el promedio y la desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad

de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar el LOX-1 con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Como se puede observar en la Tabla I, no se observó diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de los lípidos séricos entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El colesterol total (CT) y sus fracciones en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Sin embargo, en la 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma} semana de experimentación se observó un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL y c-LDL en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,0001$). Para el grupo 2 las concentraciones de los lípidos variaron desde el inicio hasta el final del experimento, observándose un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) (Tabla I).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LOS MARCADORES DE OXIDACIÓN

Como se puede apreciar en las Figuras 1, 2 y 3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de LOX-1, LDLox y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. De igual manera los marcadores de oxidación en el grupo 1 permanecieron sin cambios a lo largo del

Tabla I.
Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)
Basal			
Grupo 1	71 ± 16	37 ± 10	33 ± 11
Grupo 2	69 ± 18	42 ± 11	35 ± 11
4 ^{ta} semana			
Grupo 1	74 ± 18	40 ± 12	36 ± 9
Grupo 2	286 ± 81 [†]	231 ± 48 [†]	62 ± 18 [*]
8 ^{va} semana			
Grupo 1	79 ± 19	48 ± 9	37 ± 12
Grupo 2	751 ± 151 [†]	629 ± 84 [†]	88 ± 29
12 ^{ma} semana			
Grupo 1	85 ± 18	51 ± 11	32 ± 11
Grupo 2	1008 ± 247 [†]	847 ± 102 [†]	96 ± 37 [†]
Valores p			
Grupo 1	0,9807	0,9458	0,9317
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001

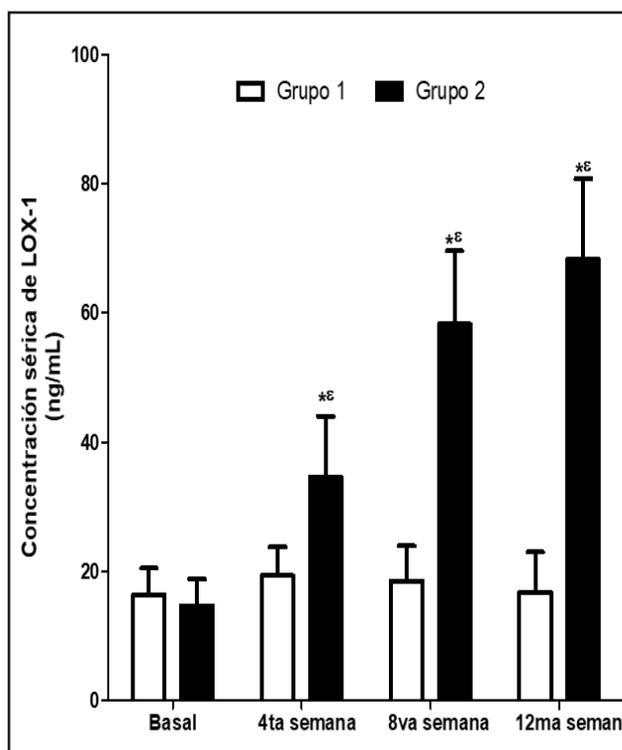


Figura 1. Concentraciones séricas de LOX-1 en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). ^{*}p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). [†]p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

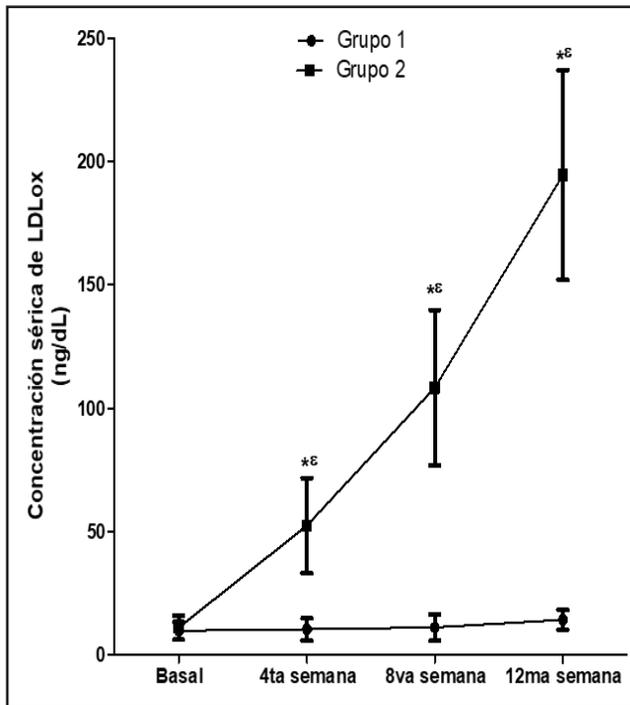


Figura 2. Concentraciones séricas de LDLox en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). ϵ p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

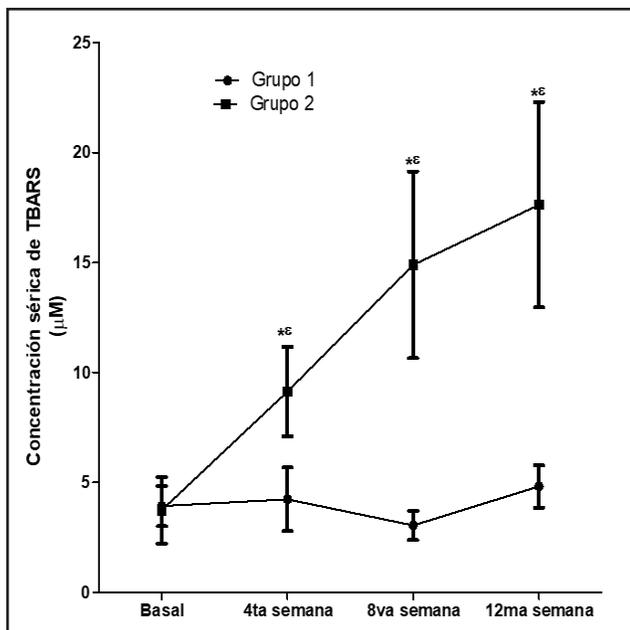


Figura 3. Concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). ϵ p<0,0001 vs. su respectivo valor basal

experimento; por su parte, en el grupo 2 variaron a lo largo del estudio (p<0,0001). En la cuarta, octava semana y al final del experimento las concentraciones séricas de LOX-1, LDLox y TBARS aumentaron significativamente en el grupo 2 si se comparan con el grupo 1 y con respecto a sus valores basales (p<0,005).

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de LOX-1, LDLox, TBARS y los lípidos séricos, evidenciando correlación positiva significativa entre la LOX-1 con LDLox, TBARS y con el perfil lipídico (p<0,0001).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta, evidenciando que ningún conejo del grupo 1 presentó lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado intermedio y avanzado al finalizar el estudio (Figura 4).

Discusión

La oxidación de las LDL es un factor crucial para la aterosclerosis pues contribuye con la disfunción endotelial, la cual está caracterizada por alteraciones en las propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias del endotelio y su incapacidad de regular el tono vascular (Pirillo y col., 2013; Marchio y col., 2019). El estrés oxidativo está caracterizado por un desbalance entre la producción de ROS, y los sistemas de defensa antioxidantes. El incremento de las ROS conlleva la oxidación de las LDL, formando las LDLox,

Tabla II.

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de LOX-1, LDLox, TBARS y los lípidos séricos

	r	p
LOX-1 & CT	0,3594	0,0001
LOX-1 & c-LDL	0,2795	0,0001
LOX-1 & c-HDL	0,1979	0,0001
LOX-1 & LDLox	0,5176	0,0001
LOX-1 & TBARS	0,2459	0,0001

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidada, LOX-1: Receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina -1, TBARS: Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

las cuales juegan un papel importante en la aterogénesis, pues ejerce efecto sobre las células endoteliales, plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células de músculo liso, a través del receptor glicoproteína transmembrana LOX-1. Adicionalmente, otros SR tales como CD-36 y SR-A, pueden contribuir a la internalización de las LDLox y a la formación del ateroma (Mehta y col., 2002; Kattoor y col., 2019).

Diversos SR han sido identificados en base a su capacidad de eliminar a lípidos modificados. Se ha reportado que todos los SR unen LDL modificadas, excepto el SCARA-5 (Clase A) y LAMP (Clase D) (Plüddemann y col., 2007). Por su parte, el SR-A tipo 1 y II, CD-36 y LOX-1 están involucrados en la formación de las células espumosa mediante la internalización de LDL modificadas; de hecho, estudios *in vitro* sugieren que el SR-A y CD-36 contribuyen hasta con el 75% – 90% de la captación de las LDLox (Kunjathoor, 2002).

El LOX-1, es una proteína de membrana tipo II, de 50 KDa, miembro de los SR de clase E, que tiene un dominio extracelular, transmembrana y citoplasmático; constituye el principal receptor para las LDLox en las células endoteliales, y puede mediar la unión, internalización y degradación proteolítica de las LDLox (Mehta y col., 2002). El LOX-1 se expresa en una amplia variedad de células como las endoteliales, macrófagos, células de músculo liso vascular, cardiomiocitos, plaquetas y

Tabla III.

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Cuarta semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Octava semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	2 (29%)	2 (29%)	3 (42%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (29%)	5 (71%)	0 (0%)

Datos presentados como n (%)

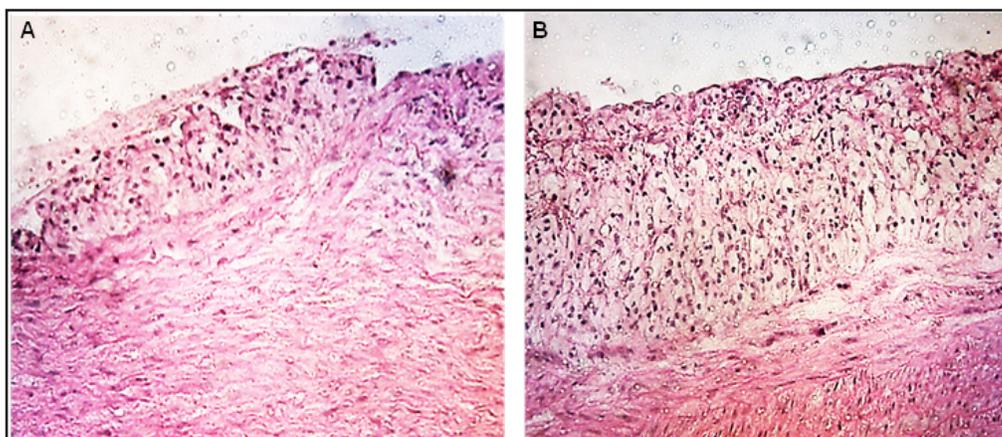


Figura 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos a lo largo del estudio. Lesión tipo II (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 1 en la 4^a semana. Se observa un cúmulo de lípidos intracelulares. Lesión tipo IV (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 2 al final del estudio. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Tinción hematoxilina – eosina. 50X.

fibroblastos (Kattoor y col., 2019; Tone y col., 2019).

Se ha descrito que el LOX-1 contribuye con la disfunción endotelial y apoptosis, y participa en la formación de las células espumosas en macrófagos y células de músculo liso; asimismo, se ha postulado que la expresión de LOX-1 puede ser inducida por diversas condiciones y factores pro-aterogénicos, tales como la diabetes, hipertensión y dislipidemias, el estrés de rozamiento, productos de glicosilación avanzada, las LDLox, diversas citoquinas y la angiotensina II a través del receptor tipo 1 (Kattoor y col., 2019). Por otra parte, se ha descrito que el LOX-1-soluble (sLOX-1) es un marcador sérico de diversas enfermedades cardiovasculares. Éste se forma cuando la porción extracelular del receptor LOX-1 se escinde por acción de metaloproteinasas, formando la sLOX-1; de hecho, existen reportes que indican que es un marcador temprano de disfunción endotelial en el síndrome metabólico (Civelek y col., 2015). Sus niveles elevados han sido asociados con hipertensión y diabetes mellitus tipo 2 (Civelek y col.,

2015). Asimismo, Hayashida y col. (2005) encontraron mayores niveles de sLOX-1 en pacientes con síndrome coronario agudo mostrando además ser un marcador más temprano que la troponina T, sugiriendo que la sLOX-1 podría ser considerado un marcador temprano de inestabilidad de la placa.

En el presente estudio pudimos apreciar que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un incremento en las concentraciones séricas de LOX-1, el cual se vio acompañado de un aumento en los niveles de LDLox y TBARS y de la formación de lesiones ateroscleróticas; evidenciando además asociación positiva entre dichos marcadores de oxidación. En este sentido, se ha descrito que las LDLox y las ROS juegan un papel importante en la aterosclerosis, pues inhibe la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y contribuye con la generación de ROS (Goyal y col., 2012), lo cual induce la expresión de moléculas de adhesión celular, proliferación de macrófagos, formación de colágeno, migración de células de músculo liso y activación plaquetaria, eventos

claves en la aterosclerosis (Kattoor y col., 2019; Khatana y col., 2020; Zingg y col., 2021). De hecho, en estudios previos demostramos que la administración de una dieta enriquecida con colesterol incrementó los niveles séricos de LDLox y TBARS desde la 6ta semana de experimentación, siendo esto revertido con la administración oral de antioxidantes, lo cual se vio acompañado de una reducción en la formación y severidad de lesiones ateroscleróticas (Figueira y González, 2008, 2022). Asimismo, Xu y col. (2022), encontraron que la relación LDLox/ LDL-c es un marcador para el diagnóstico temprano de aterosclerosis coronaria en pacientes con diabetes. Por su parte, Chen y col. (2022) demostraron mayores niveles séricos de LDLox en pacientes con enfermedad arterial coronaria, sugiriendo que el mismo es un marcador sérico de enfermedad cardiovascular, lo cual corrobora la importancia del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la aterosclerosis y su participación desde las primeras fases de esta enfermedad.

El papel del LOX-1 sobre la aterosclerosis ha sido inequívoco; de hecho, se ha descrito que la delección del gen LOX-1 en ratones que recibieron una dieta enriquecida con colesterol durante 18 semanas estuvo asociada con disminución del estrés oxidativo, de la respuesta inflamatoria, degradación del NO y aterosclerosis (Mehta y col., 2007); y además disminuyó la formación de colágeno en regiones ateroscleróticas (Hu y col., 2008). Por ello, el LOX-1 es considerado actualmente como un potencial blanco terapéutico; de hecho muchas de las terapias cardiovasculares convencionales disponibles actualmente tales como la aspirina, estatinas e hipoglicemiantes orales ejercen efectos indirectos sobre la expresión de LOX-1 y

sobre la aterosclerosis (Mehta y col., 2004). Por otra parte, diversos antioxidantes han demostrado modular la expresión del LOX-1; en este sentido, el extracto de *Gingko biloba*, la cúrcuma y el ácido elálgico disminuye la expresión de LOX-1. Igualmente, el pycnogenol, la vitamina E y C, el resveratrol y la quercetina reducen la generación de LDLox mediada por ROS y la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas (Figueira y González, 2008; Pothineni y col., 2017).

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de los marcadores de oxidación evaluados en el presente estudio se evidenció desde la cuarta semana de experimentación, lo cual sugiere que la LDLox, TBARS y LOX-1 son marcadores tempranos de aterosclerosis; pues intervienen en el inicio y progresión de esta enfermedad. De hecho, Chen y col. (2000) demostraron que la expresión de ARN y la proteína del LOX-1 está incrementada en la aorta de conejos Watanabe, un modelo experimental de aterosclerosis, evidenciando un incremento en la expresión de esta molécula a nivel de las células endoteliales de las arterias afectadas con lesiones ateromatosas de diferente grados, mostrando mayor expresión en las lesiones avanzadas; e inclusive demostraron expresión de LOX-1 en las células endoteliales de las arterias que aún no estaban afectadas, sugiriendo que el LOX-1 podría estar involucrado desde las primeras fases de la aterosclerosis. En este sentido, la evidencia indica que la interacción entre LDLox – LOX-1 juega un papel relevante en la aterosclerosis, promoviendo la disfunción endotelial y perpetuando un ambiente proinflamatorio y oxidativo característico desde las fases iniciales de la aterosclerosis. En este sentido,

se ha demostrado que la interrelación entre LDLox y LOX-1 conlleva la fosforilación de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK) (Dandapat y col., 2007), resultando en un aumento en la producción de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1) y citocinas como la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) (Aoyama y col., 1999), las cuales previamente hemos demostrado se encuentran incrementadas desde las primeras fases de la aterosclerosis (González y col., 2008; Figueira y González, 2018; 2020). Este ambiente inflamatorio incrementa la expresión de LOX-1 en las células endoteliales perpetuando un círculo vicioso de oxidación e inflamación entre LDLox y LOX-1 (Feng y col., 2014). De igual manera, Stancel y col., (2016) propusieron que la PCR y el LOX-1 forman un mecanismo cíclico con las LDLox en la aterogénesis, pues la PCR es un ligando del LOX-1 e incrementa la permeabilidad vascular, altera la vasodilatación dependiente del endotelio y juega un papel importante en la adhesión de monocitos al endotelio. Por otra parte, la inducción del LOX-1 reduce la fosforilación de la proteína quinasa B, la cual está involucrada en la activación de la eNOS mediante su fosforilación, disminuyendo la producción de NO (Besler y col., 2011). Además, la LDLox incrementa la producción de vasoconstrictores como la endotelina -1, e incrementa la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Singh y col., 2003), así como la producción de ROS mediante el incremento en la expresión y actividad de la NADPH oxidasa, lo cual se acompaña con una menor biodisponibilidad del NO, conllevando la disfunción endotelial (Kattoor y col., 2019).

El aumento de las concentraciones séricas de LOX-1, LDLox y ROS observados

en el presente estudio probablemente son debidos al proceso inmunoinflamatorio y oxidativo de la aterosclerosis inducido por la dieta enriquecida con colesterol; pues se ha descrito que la expresión de este receptor es baja en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de un medio inflamatorio y oxidativo, se incrementa la expresión de LOX-1 (Xu y col., 2013). De hecho, la evidencia indica que la LDLox es el activador más potente de la LOX-1, pues la unión del LDLox a su receptor LOX-1 activa el factor nuclear κ B (NF- κ B), incrementando la expresión de LOX-1 y de otras moléculas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales (Aoyama y col., 1999; Kattoor y col., 2019). Asimismo, moléculas pro-inflamatorias tales como el TNF- α , la interleucina -1 (IL-1), interleucina -6 (IL-6) inducen la expresión de LOX-1 en células de músculo liso vascular. De igual manera, la activación de LOX-1, agrava el estrés oxidativo, lo que ocasiona una mayor formación de LDLox, auto-amplificando el ciclo (Xu y col., 2013), pues el LOX-1 incrementa la producción de ROS, al incrementar la actividad de la NADPH oxidasa por una vía mediada MMP14 – Rac 1. En este sentido, la inhibición de la unión LOX-1 a MMP14 disminuiría el estrés oxidativo (Sugimoto y col., 2009). Asimismo, se ha descrito que la LDLox induce la formación de ROS mediante el incremento de la expresión de NOX2, NOX4 y p47phox, y además activa la NF-KB a través de LOX-1, lo cual activa vías proinflamatorias y al LOX-1 ocasionando un círculo vicioso de mayor captación de LDLox a través del LOX-1 activado, mayor formación de ROS y mayor expresión de LOX-1 (Xu y col., 2013). Así, la deleción de LOX-1 en ratones alimentados con dieta alta de colesterol ha demostrado disminuir

la expresión de NOX2, NOX4, p22phox y p47phox (Hu y col., 2008; Lu y col. 2011).

Diversos eventos podrían explicar el aumento en la formación de placas ateroscleróticas inducidas por la administración de una dieta enriquecida con colesterol observado en el presente estudio; en este sentido se ha descrito que la expresión de LOX-1 en macrófagos, células musculares lisas y endoteliales se ve incrementada en estados proinflamatorios resultando en un aumento de la fagocitosis de las LDLox por parte de los macrófagos y células de músculo liso (Yang y col., 2012), contribuyendo con la acumulación de lípidos y a la formación de las células espumosas. Asimismo, se ha descrito que la LDLox y LOX-1 pueden causar inestabilidad de la placa mediante un aumento en la producción de metaloproteasas de matriz extracelular (Yang y col., 2013; Kattoor y col., 2019).

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo con los resultados obtenidos, el LOX-1, LDLox y TBARS son marcadores tempranos no invasivos de oxidación y aterosclerosis; pues se elevaron desde la 4ta semana de estudio. Estos hallazgos sugieren que la oxidación juega un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad, por lo que su determinación podría ayudar en el diagnóstico temprano, evaluación y estratificación del riesgo cardiovascular.

Referencias Bibliográficas

- Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, Matsuoka R, Yoshida M, Fujiwara H, Masaki T. 1999. Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem J* 339: 177.
- Besler C, Heinrich K, Rohrer L, Doerries C, Riwanto M, Shih D, Chroni A, Yonekawa K, Stein S, Schaefer N. 2011. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Investig* 121: 2693-708.
- Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, Sawamura T. 2000. Increased expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arter Thromb Vasc Biol* 20: 1107-15.
- Chen Q, Li Z, Wang M, Li G. 2022. Over-expression of IL1R2 in PBMCs of Patients with Coronary Artery Disease and Its Clinical Significance. *Anatol J Cardiol* 26(9):710-716.
- Civelek S, Kutnu M, Uzun H, Erdenen F, Altunoglu E, Andican G, Seven A, Sahin A, Burcak G. 2015. Soluble Lectin-Like Oxidized LDL Receptor 1 as a Possible Mediator of Endothelial Dysfunction in Patients With Metabolic Syndrome. *J Clin Lab Anal* 29: 184-90.
- Dandapat A, Hu C, Sun L, Mehta J. 2007. Small Concentrations of oxLDL Induce Capillary Tube Formation from Endothelial Cells via LOX-1-Dependent Redox-Sensitive Pathway. *Arter Thromb Vasc Biol* 27: 2435-42.
- Feng Y, Cai Z, Tang Y, Hu G, Lu J, He D, Wang S. 2014. TLR4/NF-κB signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Genet Mol Res* 13: 680-95.
- Figueira L, González J. 2008. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *Informe Médico* 10 (10): 593-607.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. (Effect of resveratrol on seric vascular endothelial growth factor concentrations during atherosclerosis). *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209-216.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm UCV* 83 (1y2): 7-23.
- Figueira L, González J. 2022. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1. *Rev Fac Farma UCV*; 85(1y2): 51-66.

- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12 (2): 50-57.
- Gorga E, Vizzardì E, Bonadei I, Piovanelli B, Della P, Raddino R, Dei C. 2013. LOX-1 and its Implications on Cardiovascular Diseases a Possible New Perspective Target on Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol* 4(4):232.
- Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta J. 2012. Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 14: 150-9.
- Hayashida K, Kume N, Murase T. 2005. Serum Soluble Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Levels Are Elevated in Acute Coronary Syndrome: A Novel Marker for Early Diagnosis. *ACC Curr J Re*; 14: 3.
- Hu C, Dandapat A, Sun L, Chen J, Marwali M, Romeo F, Sawamura T, Mehta J. 2008. LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet. *Cardiovasc Res* 79: 287-93.
- Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1. 2019. Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)* 11;8(7):218.
- Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK. 2020. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2020:5245308.
- Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. 2019. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem* 27;400(6):711-32.
- Kuge Y, Kume N, Ishino S. 2008. Prominent lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharmac Bull* 31(8):1475-82.
- Kunjathoor V. 2002. Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low-Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J Biol Chem* 277: 49982-8.
- Lu J, Mitra S, Wang X, Khaidakov M, Mehta J. 2011. Oxidative Stress and Lectin-Like Ox-LDL-Receptor LOX-1 in Atherogenesis and Tumorigenesis. *Antioxid Redox Signal* 15: 2301-33.
- Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. 2019. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019:8563845.
- Mehta J, Dayuan L. 2002. Identification, Regulation and Function of a Novel Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor. *J Am Col Cardiol*; 39 (9):1429-35.
- Mehta J, Li D, Chen J, Yu F. 2004. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* 64: 243-9.
- Mehta J, Sanada N, Hu C, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K. 2007. Deletion of LOX-1 Reduces Atherogenesis in LDLR Knockout Mice Fed High Cholesterol Diet. *Circ Res* 100: 1634-42.
- Ogura S, Kakino A, Sato Y, Fujita Y, Iwamoto S, Otsui K, Yoshimoto R, Sawamura T. 2009. LOX-1 the multifunctional receptor underlying Cardiovascular Dysfunction. *Circulation* 73:1993-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Rev Anal Biochem* 95(2);351-8.
- Pirillo A, Norata G, Catapano A. 2013. LOX-1, OxLDL and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013:152786.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. 2007. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43: 207-17.
- Pothineni N, Karathanasis S, Ding Z, Arulandu A, Varughese K, Mehta J. 2017. LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *J Am Coll Cardiol* 69: 2759-68.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083-9.
- Reiss A, Anwar K, Wirkowski P. 2009. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis. *Curr Med Chem* 16(21):2641-52.
- Singh R, Chen H, Kazzaz N, Li D, Liu L, Mehta J. 2003. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin-converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 5: 238-43.
- Stancel N, Chen C, Ke L, Chu C, Lu J, Sawamura T, Chen C. 2016. Interplay between CRP,

- Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 62: 320-27.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Am Heart Asso Circulation* 15:1512-31.
- Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y. 2009. LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 84: 127-36.
- Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. 2013. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 plays an important role in vascular inflammation in current smokers. *J Atheroscler Thromb* 20(6):585-90.
- Tone K, Stappers M, Willment M, Brown G. 2019. C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease. *Eur J Immunol* 49: 2127-2133.
- Xu S, Ogura S, Chen J, Little P, Moss J, Liu P. 2013. LOX-1 in atherosclerosis: Biological functions and pharmacological modifiers. *Cell. Mol. Life Sci*; 70: 2859-72.
- Xu L, Yan X, Tang Z, Feng B. 2022. Association between circulating oxidized OxLDL/LDL-C ratio and the severity of coronary atherosclerosis, along with other emerging biomarkers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 191:110040.
- Yang H, Mohamed A, Zhou S. 2012. Oxidized low-density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 11: 85.
- Yang S, Li Y, Du D. 2013. Oxidized low-density lipoprotein-induced CD147 expression and its inhibition by high-density lipoprotein on platelets *in vitro*. *Thromb Res* 132: 702-11.
- Zingg J, Vlad A, Ricciarelli R. 2021. Oxidized LDLs as signaling molecules. *Antioxidants* 10(8): 1184.



Efecto comparativo de la actividad antioxidante del Ácido Gálico y diferentes Alquilgalatos

Comparative effect of the antioxidant activity of Gallic Acid and different Alkygallates

LYNG MEI RODRÍGUEZ^{1,a}, NATALIA RUIZ FLORES^{2,a}, DIANA SANGOI FERREIRA^a, ANA MILENA GUERRERO^{3,a}, CARLOS CIANGHEROTTI^{4,b}, JAIRO BERMÚDEZ^{5,c}, MARY LORENA ARAUJO^{6,d}, ANITA ISRAEL^{7,b}, MARISABEL BOR^{8,a}

Resumen

Los compuestos polifenólicos poseen actividad antioxidante, por lo que son sustancias con la capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo. En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de ácido gálico (AG) y los alquilgalatos: metil galato (MG) y etilgalato (EG) por 3 métodos diferentes, a saber: óxido nítrico, DPPH• y peróxido de hidrógeno. Con el radical de óxido nítrico se obtuvo que AG mostró mayor efecto antioxidante, seguido por el MG y EG, con valores de IC₅₀ 31,303 μM, 38,846 μM, 58,308 μM, respectivamente. Con una diferencia estadísticamente significativa entre el AG y EG, con valor de p<0,05. Con DPPH• se observó que EG obtuvo mayor actividad antioxidante seguido MG, PG y AG, con valores de IC₅₀ 7,687μM, 14,963 μM, 16,529 μM, 20,698 μM, respectivamente. Se observó una diferencia significativa entre MG y AG con p< 0,05 y entre EG y AG con un p<0,001. Con el peróxido de hidrógeno se encontró que el compuesto EG presenta menor actividad antioxidante seguido por AG y MG, con valores de IC₅₀ 218,67 μM, 108,53 μM y 86,01 μM, respectivamente. Presentando una diferencia significativa entre el EG y AG, con p< 0,05. Los resultados sugieren que AG y sus derivados podrían funcionar como una fuente de antioxidantes para fines terapéuticos y nutricionales.

Palabras clave: ATBS, antioxidante, ácido gálico, alquil galatos, DPPH•, etil galato, Folin - Ciocalteau, IC₅₀, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa, propil galato, PBS, peróxido de hidrógeno, ROS, RNS

Abstract

Polyphenolic compounds have an antioxidant effect, being substances with the ability to protect cells from free radicals. In this work we assessed the antioxidant effect of gallic acid (AG) and the alkyl gallates methyl gallate (MG) and ethyl gallate (EG) by 3 different methods, these were: nitric oxide, DPPH•, and hydrogen peroxide. With the nitric oxide radical it was obtained that AG showed the greatest antioxidant effect, followed by MG and EG, with IC₅₀ values of 31.303 μM, 38.846 μM, and 58.308 μM, respectively. With a statistically significant difference between AG and EG, with a value of p<0.05. With DPPH• it was observed that EG obtained higher antioxidant activity followed by MG, PG, and AG with a IC₅₀ values of 7.687μM, 14.963 μM, 16.529 μM, 20.698 μM, respectively. A significant difference was observed between MG and AG with p< 0.05 and between EG and AG, with a value of p<0.001. With hydrogen peroxide, it was found that the compound EG presents less antioxidant activity followed by AG and MG, with IC₅₀ values of 218.67 μM, 108.53 μM, and 86.01 μM, respectively. Presenting a significant difference between the EG and AG, with p< 0.05. The results suggest that AG and its derivatives could function as a source of antioxidants for therapeutic and nutritional purposes.

Keywords: ATBS, antioxidant, gallic acid, alkyl gallates, DPPH•, ethyl gallate, Folin - Ciocalteau, IC₅₀, nitric oxide, nitric oxide synthase, propyl gallate, PBS, hydrogen peroxide, ROS, RNS

^aLaboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

^bLaboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, ^cLaboratorio de Productos Naturales, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ^dCentro de Equilibrios en Solución, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. *Correspondencia: marisabel.bor@gmail.com y carlosciangherotti@yahoo.com

Orcid: ¹ [0009-0006-5418-0256](https://orcid.org/0009-0006-5418-0256)

² [0009-0009-8143-0128](https://orcid.org/0009-0009-8143-0128)

³ [0009-0006-5441-7276](https://orcid.org/0009-0006-5441-7276)

⁴ [0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)

⁵ [0009-0004-6041-6443](https://orcid.org/0009-0004-6041-6443)

⁶ [0000-0002-4755-7186](https://orcid.org/0000-0002-4755-7186)

⁷ [0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

⁸ [0009-0009-4422-9054](https://orcid.org/0009-0009-4422-9054)

Introducción

Las especies químicas que se consideran radicales libres son moléculas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad, y por lo tanto se caracterizan por su alta reactividad química. Desde el punto de vista celular se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran, la cadena de transporte de electrones, la NADPH oxidasa y otras reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo Gutiérrez, 2002). A nivel biológico, las especies reactivas de oxígeno (ERO) importantes son los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico (NO^{\cdot}) radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y moléculas no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cuales pueden oxidar biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y como consecuencia inducir daño celular bajo una condición conocida como estrés oxidativo (Burton y Jauniaux, 2011). En la Figura 1 se muestran las principales EROs y su metabolismo celular.

Los antioxidantes son sustancias químicas capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los que son captados por los radicales libres. El estudio de este tipo de reacciones ha permitido conocer cómo el uso de los antioxidantes protege a las células, impidiendo su deterioro por el efecto de los radicales libres. Entre los antioxidantes más comunes se encuentran los polifenoles, tales como resveratrol, rutina, quercetina y ácidos fenólicos como el ácido gálico (AG). Los compuestos polifenólicos (CPF) son metabolitos secundarios de las plantas

que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Los CPF se clasifican como ácidos fenólicos (AF), flavonoides (FLA) y taninos (TAN). La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres. Además, los flavonoides por su bajo potencial son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (ERO), altamente oxidadas. En general los compuestos polifenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos mencionados (Quiñones y col., 2012).

El AG, también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, es el antioxidante objeto de este trabajo, junto a sus ésteres de alquilo: metil galato (MG) y etilgalato (EG) y propilgalato (PG). El AG es un producto natural, perteneciente al grupo de taninos hidrolizables, que se encuentra en diversas plantas. Este polifenol ha sido ampliamente utilizado en investigación analítica como estándar, para determinar el contenido de fenoles en diversas muestras. Tanto él como sus ésteres han sido utilizados en la industria de alimentos y de cosméticos, así como también sus propiedades medicinales como fármacos han sido ampliamente estudiados, en donde lo más promisorio es la actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria (Lu y col., 2006; Khaledi y col., 2011; Liu y col., 2014; Badhani y col., 2015; Kosuru y col., 2018).

Aunque la actividad antioxidante de estos galatos ha sido demostrada, existen pocos estudios que comparen estas moléculas en varios modelos experimentales. Por ello, se realizó un estudio para comparar

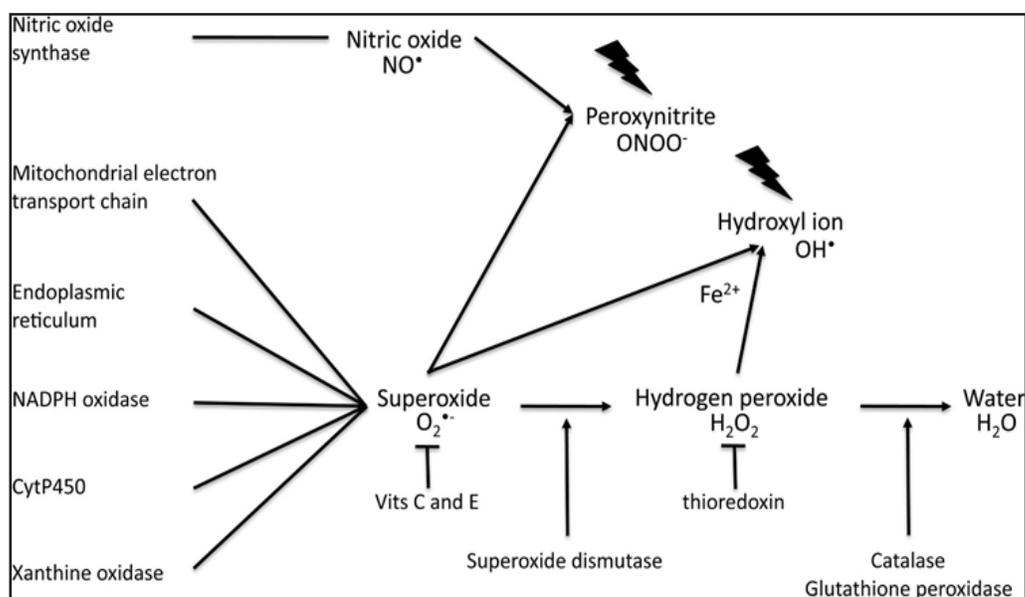


Figura 1. Principales especies reactivas de oxígeno. Fuentes y vías de metabolismo (Tomado de Burton y Jauniaux, 2011)

el AG, MG, ET en ensayos en medio acuoso de captación de NO^\bullet y de H_2O_2 , basada principalmente en la determinación de la capacidad captadora de NO y H_2O_2 , dos de las especies más involucradas en el estrés nitrosativo y oxidativo, respectivamente. La evaluación antioxidante de AG, MG, ET y PG, se realizó mediante el ensayo de captación de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH \bullet en medio alcohólico, que permite evaluar su capacidad antioxidante mediante métodos espectrofotométricos. Con este trabajo se pretendió discriminar las características captadoras de especies reactivas y sentar las bases para la selección de el o los compuestos con mejor perfil de potencia antioxidante para futuros estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*. El conocimiento de las potencias antioxidantes de estos compuestos permitirá la elección del mejor candidato antioxidante no solo a nivel biológico sino a nivel de las preparaciones cosméticas, de alimentos, entre otros.

La información acerca de los múltiples comportamientos antioxidantes que pueden tener estos diferentes compuestos podría estar relacionado a los posibles beneficios en el tratamiento o prevención de enfermedades que cursen con el incremento de las ERO, de manera que podría tener impacto en la actividad terapéutica de estos potenciales fármacos. Es importante mencionar que las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo son precisamente las de mayor impacto en la salud pública, tales como el cáncer, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial.

El presente estudio tiene por objetivo evaluar la actividad antioxidante del ácido gálico y alquil galatos y así determinar y comparar el desempeño de estos compuestos. Para ello se determinó la actividad captadora de óxido nítrico, la actividad captadora del radical DPPH \bullet y la actividad captadora de peróxido de hidrógeno del ácido gálico y alquil galatos,

y comparar los resultados obtenidos (curvas e IC_{50}) de actividad antioxidante del ácido gálico en relación con los alquil galatos.

Métodos

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Para la evaluación de la capacidad atrapadora de óxido nítrico ($NO\cdot$) del ácido gálico y los galatos, se utilizó el método de Griess modificado (Alam y col., 2013). Para ello, se utilizó un sistema *in vitro* de producción de NO inducido por nitroprusiato de sodio. Se sabe que el compuesto nitroprusiato de sodio se descompone en solución acuosa a un pH fisiológico (7,2) y produce un punto radical NO. En condiciones aeróbicas, el punto radical NO reacciona con el oxígeno para producir productos estables (nitrato y nitrito), cuyas cantidades pueden determinarse utilizando el reactivo de Griess (1,0 mL de reactivo de ácido sulfanílico, 0,33% en ácido acético glacial al 20% a temperatura ambiente; solución A) durante 5 min con 1 mL de dicloruro de naftilendiamina (0,1% p/v; solución B) añadiendo 200 μ L en 100 μ L de amortiguador de fosfatos pH 7,4, siendo este considerado como el punto de concentración 0 μ M de las sustancias de análisis, mientras los tubos de muestra eran tubos Eppendorf a los que se les adicionaron 100 μ L de concentraciones crecientes tanto del ácido gálico como de los galatos. El nivel de $NO\cdot$ se cuantificó indirectamente mediante la conversión en nitritos (NO_2^-), principal producto de la degradación de $NO\cdot$. Se añadió a las muestras 100 μ L de "Solución A" y se esperó durante 10 minutos para la formación de la respectiva sal de

diazonio. Se añadieron 100 μ L de "Solución B" y se esperaron 10 min para realizar la reacción de acoplamiento.

Para la preparación de las muestras se preparó una solución Madre de 19200 μ M de ácido gálico y los alquil galatos, se diluyó con PBS (*Phosphate Buffer Saline*) hasta obtener soluciones de concentraciones diferentes (1920; 960; 480; 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875 μ M).

Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de máxima absorción de 595 nm de las concentraciones finales (640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μ M).

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de $NO\cdot$ atrapado o% de inhibición, a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

donde A_0 es la absorbancia antes de la reacción (0 μ M de los galatos) y A_1 (la absorbancia de la muestra) es la absorbancia después de que haya tenido lugar la reacción con el reactivo de Griess.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ÁCIDO GÁLICO, ALQUIL GALATOS CON EL MÉTODO DE DPPH•

La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•), con algunas modificaciones (Villaño y col., 2007). Se preparó una solución Madre de 19200 μ M de ácido gálico e igualmente con los alquil galatos, se diluyó con metanol hasta obtener soluciones patrones de concentraciones diferentes (1920; 960; 480; 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875 μ M). Para realizar el

ensayo se agregaron 100 μL de cada una de las soluciones madre en distintos tubos de capacidad de 1000 μL , se agregaron 50 μL de la solución de DPPH• a cada uno de los tubos, se esperaron 30 minutos para que ocurra la reacción entre el DPPH• y el ácido gálico o los alquil galatos, durante este período se protegió el tubo de la luz. Luego se procedió a leer en el espectrofotómetro de ELISA usando 517 nm como longitud de onda máxima absorción. Siendo el control para la absorbancia de la solución DPPH• 100%.

La capacidad de la muestra para eliminar el radical DPPH• se determinó con la misma fórmula de % de inhibición usada en el método de óxido nítrico. Donde A_0 es la absorbancia del punto de concentración 0 μM de los galatos (control) y A_1 la absorbancia de la muestra.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS CON EL MÉTODO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Antes de iniciar el ensayo se preparó una solución 30 mM de H_2O_2 en PBS pH, 7,4. Esta solución fue estandarizada.

Se prepararon las soluciones de ácido gálico y los alquil galatos a concentraciones finales de 640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 y 0 μM , las cuales se prepararon mezclando 100 μL de la solución de trabajo y 700 μL de la solución de trabajo de H_2O_2 en PBS. Posteriormente se esperaron 10 minutos para garantizar que la sustancia antioxidante hiciera el atrapamiento del H_2O_2 en la solución y se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro UV/VIS a $\lambda=230$ nm.

Se cálculo el valor de los IC_{50} de las sustancias estudiadas usando la fórmula de % de inhibición usada en los métodos anteriores. Donde A_0 es la absorbancia del punto de concentración 0 μM de los galatos (control) y A_1 la absorbancia de la muestra.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm \text{E.E.M}$). Los datos fueron analizados con el programa Prism 8, mediante la prueba de T de Student. Los resultados con valores de $p < 0.05$ y $p < 0.001$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Resultados y Discusión

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE ÓXIDO NÍTRICO

En la determinación de captación de óxido nítrico, hubo un aumento del % de inhibición a medida que se incrementa la concentración del analito de interés representado mediante una hipérbola (Figura 2). El efecto fue dependiente de la concentración hasta llegar a una etapa estacionaria de saturación" en el que se agota el radical libre.

El IC_{50} o concentración inhibitoria 50%, es definida como la concentración a la que una molécula es capaz de inhibir un proceso biológico concreto en un 50%. Se puede observar en la Figura 3 que hubo una diferencia estadísticamente significativa de EG ($p < 0,05$) en comparación con el AG, obteniéndose mayor actividad antioxidante con el ácido gálico.

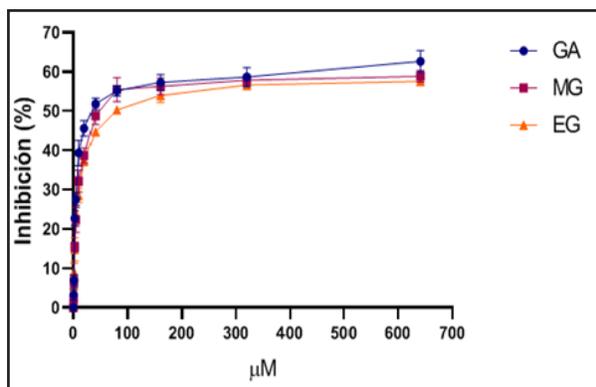


Figura 2. Captación de óxido nítrico comparativa entre GA, MG y EG

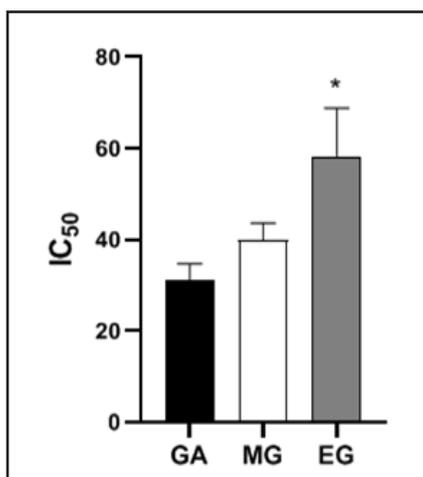


Figura 3. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) en el ensayo de captación de óxido nítrico. GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. $n=5$, $*p<0,05$ EG vs. GA

En la Tabla I se observa que la IC_{50} obtenida para el AG fue de $31,3 \mu M$, mientras que el IC_{50} de EG fue de $58,30 \mu M$, es decir que se requiere una concentración menor de AG para poder obtener el 50% de inhibición comparado con EG. El IC_{50} del AG fue menor, estadísticamente significativo, comparado con el del EG. Este resultado podría deberse a los carbonos del etilo que está en el grupo éster de la molécula del EG, ya que estos átomos logran una disminución de la solubilidad de la molécula en medios polares. Mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, el cual puede establecer puentes de hidrógeno

Tabla I.
Comparación de los IC_{50} obtenidos por el método de óxido nítrico

	Ácido gálico	Metil galato	Etil galato
Media IC_{50}	31,3	39,8	58,3
Desviación Estándar	9,5	8,5	23,5
Error estándar	3,4	3,8	10,5

con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, las cuales no puede ejercer con tanta facilidad el EG por el éster de etilo, en conclusión, a mayor prolongación en la cadena de hidrocarburos, menor es la solubilidad de la molécula en agua (Wade, 2011).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE DPPH•

En las Figuras 4 y 5 se observa que usando el método de DPPH•, entre todos los compuestos, el etil galato tiene una mayor actividad antioxidante en comparación con el ácido gálico y los diferentes alquil galatos en el estudio (metil y propil galato).

En la Tabla II se observa los diferentes valores de IC_{50} de cada uno de los compuestos, obteniendo el menor valor correspondiente a 7,7 para el EG por lo que se considera que tiene mayor actividad antioxidante que los demás derivados alquílicos y que el AG por el método de DPPH•.

Se puede observar que en los resultados del análisis de DPPH• se obtuvo un efecto concentración dependiente tanto con el AG como con sus derivados MG, EG y PG, encontrándose, que al aumentar la concentración del antioxidante de interés se obtiene un mayor porcentaje de inhibición

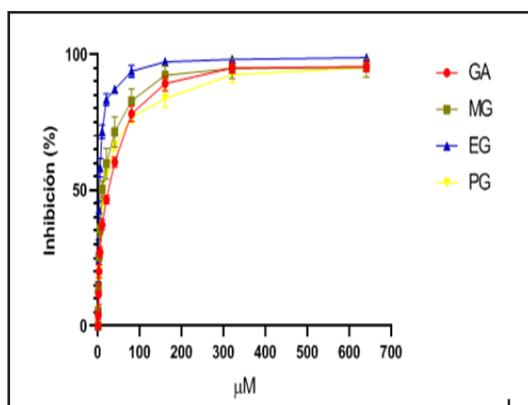


Figura 4. Captación de DPPH• comparativa entre GA, MG y EG

hasta llegar a un estado de saturación en el que se consume por completo el radical libre que está en estudio, en este caso, el DPPH• (Figura 4).

A diferencia del ensayo realizado con óxido nítrico, se puede observar mediante el análisis de la actividad antioxidante con DPPH•, que el EG mostró poseer mayor actividad antioxidante que el AG, teniendo un IC_{50} de $7,68 \mu M$, mientras que el AG presentó un IC_{50} de $20,69 \mu M$ (Tabla II). Esta diferencia en los resultados podría ser parcialmente debido al método usado, donde el solvente usado es el metanol, sustancia que a pesar de que presenta cierta polaridad por el momento dipolar que tiene el enlace C-O y el enlace C-H, es una polaridad más baja que la experimentada en el método de óxido nítrico. El ensayo de óxido nítrico usa como solvente un solvente polar como el agua y sustancias iónicas (KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 que estaban en el PBS) que aumentan la polaridad del medio.

Mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, quien puede establecer puentes de hidrógeno con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, el EG no puede establecer con tanta facilidad estas fuerzas intermoleculares por el éster de etilo que presenta como sustituyente.

Al disminuir la polaridad del medio, la molécula de EG puede establecer fuerzas intermoleculares de tipo dipolo-dipolo con el metanol del medio pudiendo esto facilitar la reacción entre el galato y el DPPH•.

El metanol posee una estructura con enlaces de tipo C-H que presentan un momento dipolar de 0,3 Debye y enlaces de tipo C-O con un momento dipolar de 0,86 Debye, presentando un lado de la molécula con un delta negativo (carga parcialmente negativa) que puede establecer puentes de hidrógeno con las moléculas que se encuentren en el medio y un lado de la molécula con un delta positivo (carga parcialmente positiva) con los que se pueden establecer fuerzas intermoleculares de menor intensidad que los puentes de hidrógeno como lo son las fuerzas de dipolo - dipolo (Wade, 2011).

EG es una estructura que posee 2 carbonos en el éster que se encuentra de sustituyente en la molécula, esto le confiere la propiedad de establecer fuerzas intermoleculares de tipo dipolo - dipolo con el metanol que se encuentra en el medio de reacción permitiendo un aumento en la velocidad de reacción. No obstante, estas fuerzas van a depender del área superficial de contacto, los dipolos son temporales y duran una fracción de segundo cambiando constantemente. Durante este proceso

Tabla II.

Comparación de los IC_{50} obtenidos por el método de DPPH•

	Ácido gálico	Metil galato	Etil galato	Propil galato
Media IC_{50}	20,7	14,9	7,7	16,5
Desviación estándar	2,9	3,6	0,9	1,4
Error estándar	1,5	1,8	0,5	0,8

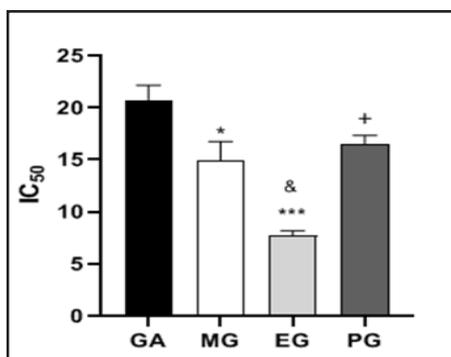


Figura 5. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en el ensayo de captación de DPPH•. GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. (AG) n=4, (MG) n= 4, (EG) n= 4, (PG) n=3. *p< 0,05 comparando el metil galato con el ácido gálico y una ***p<0,001 comparando el etil galato con el ácido gálico. & representa p<0,001 comparado el etil galato con el metil galato y +p<0,001 comparado con el propil galato con el etil galato

las moléculas se acercan tanto que violan sus radios de van der Waals. Cuando esto ocurre, la pequeña fuerza de atracción se convierte rápidamente en una gran fuerza de repulsión (Wade, 2011).

Esta podría ser la razón del aumento del IC₅₀ del PG, ya que al aumentar la superficie de contacto de la molécula por tener un número superior de carbonos (3 carbonos) aumentan las fuerzas de repulsión en el medio de reacción de DPPH•, en consecuencia, se obtiene una potencia menor que la potencia del EG, ya que se obtuvo un IC₅₀ de 16,52 μ M con PG, es decir, una potencia más baja que la potencia del EG, por lo que se requiere más concentración de PG para obtener el mismo efecto del EG (Figura 5).

Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante de los polifenoles es su grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en la molécula. Los flavonoideos debido a su heterociclo oxigenado muestran mayor actividad que los no flavonoideos. A su vez la solubilidad

y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de estructura de dicha molécula, como es el caso de los derivados glicosilados y otros aductos, lo que puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001). Los compuestos flavonoideos se suelen encontrar en los vegetales en forma de glicósidos, pero la acción de enzimas o de algunos procesos puede liberar la correspondiente aglicona. La actividad de los ácidos fenólicos está también en función de los grupos hidroxilo del anillo aromático y de la unión de estos compuestos a ácidos orgánicos y/o a azúcares para formar ésteres. Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y tipos de compuestos presentes en los alimentos (Martínez-Flórez y col., 2002)

RESULTADOS DE AG Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

En las curvas de concentración - inhibición se observa que el AG tiene un mayor poder antioxidante que el MG y EG en este ensayo y que el mismo va incrementando de manera proporcional a su concentración. Hasta llegar a un estado de saturación en el que se agota el peróxido de hidrógeno (Figura 6).

Entre los resultados del estudio de actividad antioxidante se puede notar una diferencia estadísticamente significativa con p<0,05 del IC₅₀ de EG en comparación al AG. El EG obtuvo un IC₅₀ de 218,67 μ M y el AG obtuvo un valor de IC₅₀ de 108,53 μ M (Figura 7). Esta diferencia puede deberse al número de carbonos que posee cada una de estas moléculas mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, quien puede establecer puentes de hidrógeno

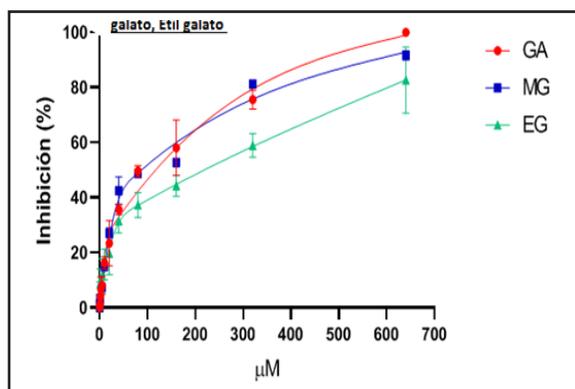


Figura 6. Captación de H_2O_2 comparativa entre GA, MG y EG

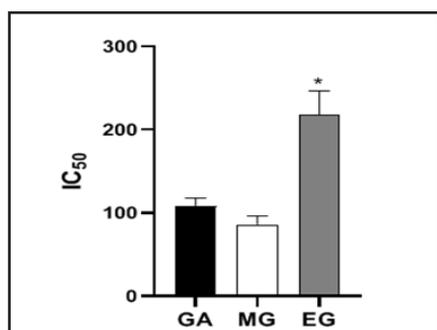


Figura 7. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) en el ensayo de captación de H_2O_2 . GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. $n=2-3$, $*p<0,05$ comparado con EG y MG.

con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, el EG no puede establecer con tanta facilidad estas fuerzas intermoleculares por el éster de etilo que presenta como sustituyente, lo que ratifica que a mayor prolongación en la cadena de hidrocarburos, menor es la solubilidad de la molécula en agua (Wade, 2011).

Se observa una diferencia numérica en los valores de AG y MG, sin embargo, la diferencia entre ambos valores no fue estadísticamente significativa. Posiblemente ello se debe al bajo número de ensayos (para AG el número de $n=3$ y para MG el número de $n=2$).

Conclusiones

El AG y sus derivados MG y EG son antioxidantes que actúan inhibiendo los radicales libres como DPPH•, NO y peróxido de hidrógeno, de manera directamente proporcional a la concentración de los galatos, ya que aumenta el % de inhibición al aumentar la cantidad de galatos hasta llegar a un estado de saturación en el que se agota el radical libre de interés.

El PG es antioxidante como captador de DPPH•, el cual fue el único ensayo probado para este derivado.

El AG presentó la mayor actividad antioxidante de las moléculas analizadas por el método de óxido nítrico al observar el valor de IC_{50} que fue de $31,30 \mu M$. Este resultado fue obtenido en un medio polar con solventes acuosos.

El EG presentó la mayor actividad antioxidante de las moléculas analizadas por el método del DPPH• al observar el valor de IC_{50} que fue de $7,68 \mu M$; demostrando que inhibió el radical del DPPH• en concentraciones más bajas.

El MG presentó la mayor actividad antioxidante entre las moléculas analizadas por el método de peróxido de hidrógeno al observar el valor de IC_{50} que fue de $86,01 \mu M$.

En el ensayo de óxido nítrico se demostró que el AG presentó una mayor actividad antioxidante que el EG, con una diferencia estadísticamente significativa y un valor de $p<0,05$.

Los hallazgos demuestran que el AG y sus derivados MG, EG y PG, presentan diferentes

efectos antioxidantes frente a los diferentes radicales ensayados DPPH•, óxido nítrico y la molécula de peróxido de hidrógeno, y sugieren que el AG y sus derivados podrían constituir una fuente de antioxidantes para fines terapéuticos y nutricionales. El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica son los causantes de un gran número de enfermedades crónicas que incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y demencia. Así, el consumo de AG y sus derivados MG, EG y PG podría reducir la incidencia y mortalidad de estas enfermedades y, este efecto protector está determinado por la presencia de estos agentes antioxidantes en estos alimentos, principalmente los polifenoles. Estos últimos como antioxidantes previenen el daño oxidativo inhibiendo la generación de especies reactivas, capturando los radicales libres o aumentando el nivel de antioxidantes endógenos protectores. Así el ácido gálico y el resveratrol (RVT) como compuestos polifenólicos, han sido ampliamente estudiados debido a su actividad anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante y antiviral y se les ha conferido un potencial para ser empleados como terapias alternativas contra distintas patologías. Igualmente se ha descrito la acción de estos compuestos sobre microorganismos de la microbiota intestinal, demostrándose que tanto el AG como el RVT poseen actividad antimicrobiana contra una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*, lo cual apoya el uso de compuestos fenólicos con potencial aplicaciones terapéuticas futura (Niño Herreran y col., 2020).

Agradecimientos

A la Fundación María Paula Alonso de Ruiz Martínez y al Laboratorio de Productos

Naturales de la Facultad de Ciencias UCV por todo el apoyo y colaboración.

Referencias Bibliográficas

- Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical J 21:143-152.
- Badhani B, Sharma N, Kakkar R. 2015. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. RSC Advances 35: 27540-27557.
- Burton GJ, Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology 25:287-299.
- Cartaya O, Reynaldo I. 2001. Flavonoides: Características Químicas Y Aplicaciones. Cultivos Tropicales 22(2):5-14.
- Khaledi H, Alhadi AA, Yehye WA, Ali HM, Abdulla MA, Hassan Darvish P. 2011. Antioxidant, cytotoxic activities, and structure-activity relationship of gallic acid-based indole derivatives. Archiv Der Pharmazie, 344(11);703-709.
- Kosuru RY, Aashique Md, Fathima A, Roy A, Bera S. 2018. Revealing the dual role of gallic acid in modulating ampicillin sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Future Microbiol 10.2217/fmb-2017-0132.
- Liu C, Chen C, Ma H, Yuan E, Li Q. 2014. Characterization and DPPH• radical scavenging activity of Gallic acid-lecithin complex. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13(8):1333.
- Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B. 2006. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. Neurochemistry International 48(4):263-274.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 17:271-278
- Niño Herreran SA, Iliná A, Chávez González ML, Martínez Hernández JL, Aguilar González CN, Rodríguez Herrera R, Flores García M, Govea Salas M. 2020. Efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos y bacterias patógenas. CienciaCierta. 63:82:92.
- Quiñones M, Miguel M, Alexandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural

- con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp* 27(1):76-89
- Venereo Gutiérrez JR. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31(2):126-33.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH• free radical. *Talanta* 71(1):230-235.
- Wade L. 2011. *Química orgánica. Volumen 1. Séptima edición.* Pearson Educación, México. ISBN: 978-607-32-0790-4.

La Revista de la Facultad de Farmacia fue creada en 1959 y constituye una publicación periódica, arbitrada, de aparición semestral, destinada a promover la difusión de artículos científicos en el área de las ciencias de la salud, así como en áreas básicas y aplicadas relacionadas con la obtención, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas Revisiones o Cartas al Editor. Los manuscritos enviados a la Revista de la Facultad de Farmacia serán revisados por el Comité Editorial y —si reúnen la calidad científica y cumplen con las normas de presentación necesarias—, serán sometidos a un proceso de arbitraje externo por personas con competencias similares a las de los productores del trabajo (pares) para su debida evaluación. Queda entendido que el Comité Editorial puede rechazar un manuscrito, sin necesidad de acudir al proceso de arbitraje, si no se incumple con lo mencionado.

El manuscrito deberá ir acompañado de una carta de solicitud firmada por el autor responsable. En caso de ser aceptado, el Comité Editorial no se hace responsable del contenido expresado en el trabajo publicado. Aquellos manuscritos que no se acojan a las condiciones indicadas o que

sean rechazados por dos de los árbitros que dictaminen sobre su calidad y contenido, no serán publicados y serán devueltos a los autores.

FORMA Y PREPARACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

Para la publicación de trabajos científicos en la Revista de la Facultad de Farmacia, los mismos estarán de acuerdo con los requisitos originales para su publicación en revistas biomédicas, según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (2012, 2013¹). Además, los editores asumen que los autores de los artículos conocen y han aplicado en sus estudios la ética de experimentación (Declaración de Helsinki, y el Código de Bioética y Bioseguridad, 2da. edición, 2002, del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Los manuscritos deben ser enviados a los correos de contacto indicados en http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/about/contact o directamente al correo del editor: astern88@gmail.com. Deben estar en formato Word, en hoja tamaño carta a doble espacio, con letra Arial 12. Asegúrese de que no haya dobles espacios en blanco a lo largo del texto.

Todas las páginas deben ser numeradas correlativamente, empezando por el título. El número de la página deberá colocarse en el ángulo superior derecho de cada página. Su longitud no debe exceder de veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas. Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

¹ http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html;
http://bvs.sld.cu/revistas/recursos/vancouver_2012.pdf

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los)autor(es), su filiación institucional y su email. Todo autor debe declarar su número ORCID².
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos. En esta sección se describirán los agradecimientos a personas e instituciones, así como los financiamientos.
- e. Conflicto de interés. Debe declararse la existencia o no de conflicto de interés por el autor o los autores del estudio.
- f. Referencias bibliográficas.
- g. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título en la parte superior y llamadas al pie de la tabla.
- h. Figuras: cada una en página aparte con su título en la parte inferior.
- i. Leyenda de las figuras.

1. La página del título deberá contener: Título del artículo en español e inglés, conciso e informativo, no mayor de veinte palabras. Primer nombre e inicial del segundo nombre y apellido(s) de los autores (con una llamada para identificar al pie de página al autor responsable de la correspondencia, indicando su dirección electrónica). Afiliación institucional y número de ORCID de cada uno de los autores.

2. La segunda página debe contener un resumen en español e inglés, con un máximo de 250 palabras. El texto debe dar una visión general del trabajo, señalar meramente el propósito, los métodos y los hallazgos. No se deben citar referencias. El

resumen debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio o de las observaciones. Inmediatamente después del resumen, proporcionar o identificar como tales 3 a 10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que puedan publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático [Medical SubjectHeading (Mesh)] del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones. La introducción debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los materiales y métodos deben contener la descripción breve y clara que permita la comprensión y la reproducibilidad del trabajo. En caso de técnicas y métodos clásicos ya publicados, se debe indicar sólo la referencia. Los resultados deben ser presentados en forma clara y precisa, con un mínimo de discusión o interpretación personal. Todas las figuras y tablas deben ser citadas en el texto. La discusión debe ser restringida a la interpretación de los resultados y eventualmente a comparar con los resultados de otros autores. Las conclusiones pueden ser incluidas dentro de la discusión; sin embargo, se puede hacer una sección aparte, indicando de forma clara y concisa los nuevos hallazgos. Se pueden incluir recomendaciones de aplicación práctica. Los agradecimientos deben hacerse a las personas o instituciones que han hecho contribuciones al estudio.

² <https://orcid.org/>

4. Referencias bibliográficas: Las mencionadas a lo largo del texto deben citarse de la siguiente manera:

- Un autor: «...fueron publicadas por González (1968)» o bien, «Se han publicado las características de... (González, 1968)».
- Dos autores: ...Álvarez y Martínez (1986),...(Álvarez y Martínez, 1987)
- Tres o más autores: ...Martínez y col. (1986), ...(Martínez y col., 1986)

Use las letras para distinguir entre varios trabajos del mismo autor o autores y año: ...(González y Pérez, 1990a,b).

Utilice punto y coma para separar autores de diversos trabajos y colóquelos en orden cronológico:...(Mijares, 1975; Brenes y Rodríguez, 1961; Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias bibliográficas» y su ordenamiento será alfabético manteniendo las estructuras mostradas en los siguientes ejemplos dependiendo del tipo de bibliografía. Deberán ser citados todos los autores de cada referencia.

ARTÍCULO EN REVISTA:

Ávila JL. 1983. New national approaches to Chagas disease chemotherapy. *Interciencia* 8: 405-417.

Ávila JL, Ávila A, Muñoz E. 1981. Effect of allopurinol on different strains of Trypanosomacrusi. *Am J Trop Med Hyg* 39(3): 769-774.

LIBROS:

Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. 2da ed. Elsevier: San Diego, Ca, USA, 2008.

CAPÍTULOS EN LIBROS:

Peters W, Robinson B. Parasitic infection models. In: *Handbook of antimalarial models of infection*. Eds: Zak O, Sande M. Academic Press: London, 1999. pp. 757-773.

Berry EP. Croton. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Eds: Berry P, Yatskievich K, Holst B. Missouri Botanical Garden Press: USA, 1999. pp. 111-133.

TESIS O TRABAJOS DE ASCENSO:

Rodríguez Caballero RL. Contribución al estudio de targuá (*Croton gossypiifolius Vahl*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias, San José, Costa Rica, 1946.

RESÚMENES EN CONGRESOS:

Muelli M. Cosméticos ecológicos y naturales ¿garantía para los consumidores?. XVIII Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. COLAMIQC, Guatemala, 2007.

5. Tablas: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Tabla I), deben presentarse en páginas separadas, a espacio sencillo, y numeradas correlativamente en números romanos con el título en la parte superior. No se debe duplicar material del texto o de las figuras. En caso necesario coloque material explicativo en notas al pie de la tabla y no en el encabezamiento; explique en notas al pie de la tabla las abreviaturas no estandarizadas o utilizadas; identifique claramente las variables tales como desviación estándar (D.S.) y error estándar de la media (E.E.M.); cite cada

tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

6. Figuras: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Figura 1, Figuras 2 y 3). Estas deben ser de buena calidad, incrustadas en el texto con su leyenda, o bien en archivos aparte en formato .jpg a una resolución de 300 ppp, en cuyo caso deberán estar identificadas con el número de la figura y el apellido del autor principal (Ejemplo: Figura 1-Matos.jpg). En este último caso las leyendas de las figuras deberán presentarse en página aparte a espacio sencillo colocando el número que corresponde a cada figura. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de fotografías de personas evite que el sujeto sea identificable, o acompañe de la autorización escrita de la misma. Cuando se usen símbolos y fechas, números o letras para identificar partes en las figuras, identifíquelas y explique cada una en la leyenda. Si se trata de fotomicrografía, indique la escala e identifique el método de coloración.

7. Fórmulas y ecuaciones: deben presentarse claramente para su reproducción.

Lista de comprobación de preparación de envíos:

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumple con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

1. La petición no ha sido publicada previamente, ni se ha presentado a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al editor).
2. El fichero enviado está en formato Open Office, Microsoft Word.
3. Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
4. El texto tiene interlineado doble; el tamaño de fuente es 12 puntos; se usa cursiva en vez de subrayado (exceptuando las direcciones URL).
5. El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las Normas para autores.

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.